

炭化水素資化性酵母の検索と培養条件*

赤木 盛郎・福永 峰子・山路 正**・高橋 勤***
坪内 一夫****・辻井 邦世*****・谷 由美子*****

Screening and Cultural Condition of Yeasts that Assimilate Hydrocarbons

Morio AKAKI, Mineko FUKUNAGA, Tadashi YAMAJI, Tsutomu TAKAHASHI,
Kazuo TSUBOUCHI, Kuniyo TSUJII and Yumiko TANI

We attempted to obtain yeast strains which utilize hydrocarbon as carbon source. In this report, three hundred and nine strains of yeast were employed. These strains included one hundred and thirty-three strains of identified yeast, i. e., forty-four strains of *Pichia*, fifty-four strains of *Hansenula*, six strains of *Saccharomyces*, ten strains of *Candida*, three strains of *Mycotorula*, five strains of *Rhodotorula* and eleven strains of *Debaryomyces*, and one hundred and seventy-six strains of unidentified yeast.

Seven strains of yeast, *Mycotorula japonica* 316, *Mycotorula japonica* 6226, *Mycotorula japonica* 6229, *Candida tropicalis* 6019, *Candida tropicalis* 6263, *Candida tropicalis* 6264 and unidentified strain Y 191, utilizing hydrocarbon as carbon source were selected.

Among these seven strains of yeast, *Mycotorula japonica* 316 and Y 191 strain, which had been isolated from oily soil by M. Akaki, one of the authors, grew abundantly, especially in the medium containing cetane as carbon source.

When ammonium sulphate was used as nitrogen source, the pH of culture media depressed extremely during cultivation. In the culture with media, which used urea instead of ammonium sulphate as nitrogen source, these yeast cultures were prevented from depression of pH during cultivation, and gave high yield of the yeast cell, parti-

*炭化水素資化性酵母に関する研究(第1報)

* Studies on Hydrocarbon Assimilating Yeast Part 1.

**興和株式会社

***江南女子短期大学

****三重県工業技術センター

*****豊橋市土木下水道課

*****名古屋女子大学

cularly Y 191 strain.

Since Y 191 strain is capable of utilizing various hydrocarbon sources and making rapid growth in the media containing hydrocarbon, it would seem to be a promising strain for cell production from hydrocarbons.

The effects of various nitrogen sources and surfactants on the growth of hydrocarbon utilizing yeast Y 191, which identified as *Candida* sp, by M. Akaki, were investigated in shaking culture on the basal medium B (Table 2) containing 1 per cent cetane as carbon source, Following results were obtained.

Four kinds of nitrogen source, i, e., urea, ammonium sulfate, ammonium chloride and ammonium nitrate, were tested. Among these four, urea was most fitted for the growth of the yeast, and gave higher yeast cell yield than the other nitrogen sources tested. Optimal concentration of urea as a nutrient for the yeast growth in the medium containing 1 per cent cetane as carbon source was between 0.2 and 0.8 per cent.

Ten kinds of surfactant shown in Table 10 were tested. Among them, Span 40, Span 80, Span 85 gave good effects on the growth of the yeast in the basal medium. Especially, Span 85 was most effective for the yeast growth. Optimal concentration of Span 85 for the growth of the yeast in the medium was between 0.005 and 0.01 per cent.

The yeast cell yield on the basis of a definite amount of the medium decreased with the increase of the volume of medium in a culture flask. However, the addition of Span 85 to the basal medium greatly prevented the yeast cell yield on the basis of a definite amount of the medium from decreasing.

緒 言

植物学者三好により、微生物が炭化水素を炭素源として生育することが、1895年に発見された¹⁾。この研究報告がパラフィン資化性微生物探索の緒となり、炭化水素に生育する数多くの微生物が見出されてきた^{2,3)}。

1940年代には、米国で急速に発達しつつあった石油工業の中で、石油埋蔵量の微生物的探索の一環として、パラフィン資化性菌についての研究が大幅の進展をした⁴⁾。

ついで1960年ごろから、炭化水素を炭素源として微生物工業の原料にとり入れる基礎的な研究が始められ、多くの成果がえられつつある。L-グルタミン酸⁵⁾、ビタミンB₂、ビタミンB₆⁶⁾、ビタミンB₁₂⁷⁾、油脂^{8,9)}、多糖類¹⁰⁾等の生産について報告されている。

微生物菌体の生産については、炭化水素を炭素源として効率的な生産をはかる研究が、酵母を中心として進められた。そして炭化水素資化性酵母の検索^{11~17)}、各種炭化水素に対する資化性、培養方法等^{18~22)}についていくつかの知見が示された。

本研究は炭化水素から有用菌体の生産を目的として基礎的な研究を行った。本報告では、まず、309株(同定株133株、未同定の分離株176株について、炭化水素資化能の高い菌株の検索を行い、資化能のすぐれた7菌株(分離酵母、*Mycotorula japonica*, *Candida tropicalis*)を選択した。これら選択株のうちで、著者のひとり赤木が、四日市市の油浸土壌から分離した *Candida* sp. Y 191株²³⁾ は増殖速度、増殖量ともすぐれていることを認めた。さらにこの分離酵母 *Candida* sp. Y 191株の生育におよぼす各種窒素源、界面活性剤その他の影響について検討した。

供試菌株および実験方法

1) 供試菌株

炭化水素資化性酵母の選択には、309株(同定株133株、未同定株分離株176株)を供試した。その内訳は、同定株には、*Pichia* sp. 44株、*Hansenula* sp. 54株、*Saccharomyces* sp. 6株、*Candida* sp. 10株、*Mycotorula* sp. 3株、*Rhodotorula* sp. 5株、*Debaryomyces* sp. 11株が含まれている。

未同定株には、赤木が分離した、キシロース資化性酵母12株、ラクトース資化性酵母6株、亜硫酸パルプ廃液からの分離酵母3株、アルコール蒸留廃液からの分離酵母7株、油浸土壌からの分離酵母9株、清酒工場からの分離酵母21株、外国土壌からの分離酵母43株、その他75株が含まれている。

2) 培養方法

菌株の選択の場合は、予備選択として、供試菌はあらかじめ Kerosene を炭素源とする培地に培養を行った。培地は Table 1 に示した A 培地を用い、115°C、15分間滅菌後、斜面とした。各供試菌はこの斜面培地上で30°C、5日間培養し、ただちに次の前培養を行った。

前培養の培養液は Table 1 の B 培地を用いた。炭化水素を除いた培養液を10mlずつ大型試験管(径30mm)に分注し、120°C、15分間滅菌した後、炭化水素は滅菌ピペットを用いて別に添加した。炭化水素としては、それぞれ本培養に使用したのと同じものを用いた。この培養液に Kerosene 培地に培養した供試菌を2白金耳接種して、30°C、

Table 1. Composition of medium.

	Medium A	Medium B
Hydrocarbon	40.0*g	20.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	3.0
KH ₂ PO ₄	2.5	2.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0	1.0
Peptone	2.0	2.0
Yeast extract	5.0	5.0
Tween-20	2.5	2.5
Agar	20.0	
Distilled water	1000ml	1000ml
pH		5.5~6.0

* Kerosene 20.0, Liquid paraffin 20.0g

2日間往復振盪器で振盪培養（振盪数 124回/分，振幅 9 cm）を行った。

本培養の培養液は前培養と同じ組成のものを用いた。500mlの振盪フラスコに培養液40mlを分注し，加圧滅菌後炭化水素を添加し，滅菌ピペットを用いて前培養液を接種した。前培養と同じ振盪条件で，30℃，2～3日間振盪培養を行った。炭化水素としては，Kerosene（比重 0.799），Liquid paraffin（比重 0.876），Light oil（比重 0.835），Cetane（比重 0.773）を用いた。炭化水素の添加量はそれぞれ2%とした。

Candida sp. Y 191株を供試菌とした場合の窒素源の影響，界面活性剤の影響，培養液量の影響についての実験では，KerosenとLiquid paraffineを炭素源とした寒天斜面培地で30℃，5日間培養して馴養した。前培養，本培養の培地組成をTable 2に示した。

Table 2. Composition of medium.

	Medium A	Medium B
Cetane*	10.0 g	10.0 g
(NH ₂) ₂ CO**	1.4	1.4
KH ₂ PO ₄	2.5	2.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	0.01
Peptone	2.0	—
Yeast extract	5.0	0.2
Tween 20	2.5	—
Distilled water	1000 ml	1000 ml
pH	5.5~6.0	5.5~6.0

* Cetane without sterilization was added to the autoclaved medium.

** Urea used as 5% solution with sterilization was added to the autoclaved medium.

本培養は500ml坂口フラスコに，Table 2に示したB培地を分注，滅菌し，菌懸濁液1mlを滅菌ピペットで接種した。培養液量はとくにことわらないかぎり100mlとし，28℃で所定時間振盪培養した。

3) 生育度の測定

菌株の検索選択実験のばあいは，培養後，培養液10mlを目盛付遠沈管に採取し，3500r.p.m.，10分間遠心分離し，沈でんした菌体容量（Packed Cell Volume）を測定して生育量を比較した。増殖量が多くて，目盛の範囲を越えるばあいは，適当に希釈して測定し希釈率を乗じた。

Candida sp. Y 191の生育におよぼす，各種窒素源の影響，界面活性剤の影響，培養液量の影響についての実験では，培養後，1mlの培養液を遠心分離し，菌体を2mlのn-Hexane

前培養は，500ml容坂口フラスコにTable 2に示したA培地100mlを分注，滅菌後，馴養した斜面より3白金耳接種し，28℃，2日間振盪培養（振盪数 124/分，振幅 6 cm）した。培養後，増殖した菌体を遠心分離（3500 r.p.m.，10分間）し，無菌水で2回洗浄した後，無菌水に懸濁して菌懸濁液とした。なお，接種量を同じにするため，この菌懸濁液の一定量を希釈して，570 nmにおけるOptical Density（以後O.D.と略す）を測定し，これが一定になる様菌懸濁液を調整した。

で洗浄し、ついで2mlの水で洗浄した後、25mlの水に懸濁し、570nmにおけるO.D.を測定した。また予め求めた検量線から乾燥菌体重量も求めた。

実験結果

1) 炭化水素資化性酵母の検索

309株の供試菌のうち選択されたものは、*Candida* 属7株、*Mycotorula* 属3株、*Pichia* 属6株、*Hansenula* 属6株、未同定株4株の合計26株であった。供試した *Saccharomyces* 属、*Rhodotorula* 属、*Debaryomyces* 属などの酵母はほとんど生育がみられなかった。

Kerosene + Liquid paraffin を炭素源として培養した供試菌のうち、比較的良好な生育を

Table 3. Yeast growth of representative strains.
(Hydrocarbon : Kerosene 1% + Liquid paraffin 1%)

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	6.0	5.6	0.61	0.74
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.2	5.9	0.68	0.48
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.1	5.8	0.59	0.58
<i>Candida tropicalis</i> 6019	6.2	6.2	0.67	0.74
<i>Candida tropicalis</i> 6263	5.7	4.6	0.71	0.69
<i>Candida tropicalis</i> 6264	5.9	4.8	0.74	0.77
<i>Hansenula anomala</i>	5.6	4.8	0.69	0.33
Y-191*	4.7	3.7	1.07	0.86
X-5**	5.7	5.3	0.49	0.49

* Isolated from oily soil.

** Xylose assimilating yeast strain.

した株の培養結果を Table 3 に示した。また同様に Kerosene, Liquid paraffin, Light oil, Cetane をそれぞれ炭素源として培養した供試菌株のうち、比較的良好な生育をした株の培養結果は Table 4 ~ 7 に示した。

Table 4. Yeast growth of representative strains.
(Hydrocarbon : Kerosene 2%)

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	6.1	5.5	0.62	0.64
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.2	5.9	0.62	0.61
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.2	5.8	0.66	0.71
<i>Candida tropicalis</i> 6019	6.3	6.1	0.67	0.73
<i>Candida tropicalis</i> 6263	5.8	5.6	0.64	0.67
<i>Candida tropicalis</i> 6264	5.7	6.2	0.73	0.70
<i>Hansenula anomala</i>	6.3	6.3	0.52	0.84
Y-191*	5.3	5.0	0.92	0.72
X-5**	6.3	6.3	0.48	0.54

*, ** See under the Table 3.

Table 5. Yeast growth of representative strains.
(Hydrocarbon : Liquid paraffin 2%)

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	6.4	6.5	1.01	1.08
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.3	6.1	0.81	0.81
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.6	6.3	0.73	0.70
<i>Candida tropicalis</i> 6019	6.4	6.2	0.80	0.66
<i>Candida tropicalis</i> 6263	6.3	6.3	0.87	0.93
<i>Candida tropicalis</i> 6264	6.3	6.4	0.80	0.73
<i>Candida utilis</i>	6.7	6.5	0.89	0.97
<i>Hansenula anomala</i>	6.4	6.2	0.78	0.80
Y-191*	6.4	6.4	0.96	0.85

* See under the Table 3.

Table 6. Yeast growth of representative strains.
(Hydrocarbon : Light oil 2%)

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	5.1	5.0	0.32	0.30
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.5	4.8	0.85	1.21
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.5	4.5	0.48	0.78
<i>Candida tropicalis</i> 6019	5.3	4.9	0.67	1.03
<i>Candida tropicalis</i> 6263	5.0	4.6	0.83	0.73
<i>Candida tropicalis</i> 6264	5.2	4.5	0.90	1.02
<i>Candida rugosa</i> LKB 611	5.4	5.3	0.76	0.70
Y-191*	5.3	5.3	1.08	0.76
X-5**	6.5	6.5	0.55	0.51

*, ** See under the Table 3.

Table 7. Yeast growth of representative strains.
(Hydrocarbon : Cetane 2%)

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	2.6	2.2	3.20	4.26
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.3	2.4	0.82	4.26
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.3	2.0	1.03	5.23
<i>Candida tropicalis</i> 6019	3.2	3.1	2.58	2.75
<i>Candida tropicalis</i> 6263	5.6	2.9	1.22	2.22
<i>Candida tropicalis</i> 6264	3.1	2.8	3.00	3.36
<i>Candida rugosa</i> LKB 611	2.6	2.1	2.77	3.14
<i>Pichia farinosa</i>	2.4	2.2	2.39	3.61
Y-191*	2.2	2.1	4.51	4.18

* See under the Table 3.

四日市市の油浸土壌からの分離酵母 Y 191 株および *M. japonica* 316 などは Cetane を炭素源として培養すると、液の pH が 2.1~2.2 まで低下した。これら以外の菌株においても、生育量が多いと培養液の pH が低下するものがみられた。その原因の一つとして、窒素源として用いた硫酸アンモニウムが考えられたので、窒素源として硫酸アンモニウムのかわりに、尿素を 0.14% 添加し炭素源としては Cetane を用いた培地で培養した。結果は Table 8 に示した。

Table 8: Yeast growth of representative strains on the hydrocarbon media containing urea instead of ammonium sulphate.

Strain	pH		Packed Cell Volume (ml/100ml)	
	After 2 days	After 3 days	After 2 days	After 3 days
<i>Mycotorula japonica</i> 316	4.0	4.0	6.66	5.10
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	6.5	6.3	0.98	0.89
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	6.5	6.4	0.80	0.32
<i>Candida tropicalis</i> 6019	4.0	4.0	3.27	4.11
<i>Candida tropicalis</i> 6263	4.0	4.2	2.55	2.26
<i>Candida tropicalis</i> 6264	4.1	3.9	4.17	6.35
Y-191*	4.7	5.0	11.46	9.00

Hydrocarbon : Cetane 2%

Nitrogen source : Urea 0.14%

* See under the Table 3.

尿素を窒素源として用いると、*M. japonica* 6226, *M. japonica* 6229 では pH 低下が防止できたが、生育量は減少した。しかし Y 191 株, *M. japonica* 316, *C. tropicalis* 6019, *C. tropicalis* 6263, *C. tropicalis* 6264 は生育量が増大し、尿素の効果がみられた。特に Y 191 株は顕著に生育量が増大した。

2) *Candida* sp. Y 191 株の生育におよぼす窒素源の影響

Table 2 の B 培地を基本として尿素のかわりに、各種の窒素源を窒素として 0.06% となるように添加した培地を調整し、1 ml の菌懸濁液 (乾燥菌体重量として 10 mg, 接種量は以下同様) を接種し、28°C, 5 日間振盪培養した生育状況と pH の変化を Fig. 1 に示した。

尿素は他の窒素源に比べて、極めて良好な生育をもたらした。pH はいずれの培養においても菌の増殖とともに急速に低下し、尿素以外の窒素源を用いた培地では 3 以下に低下した。しかし、尿素を用いた培地では pH 3~4 の範囲までの低下におさえられた。

つぎに良好な結果を示した尿素について、適当な濃度を求めるため、以下の実験を行った。Table 2 の B 培地を基本として、これに尿素を 0.005~1.6% 添加し、菌懸濁液 1 ml を接種し、28°C, 30~50 時間培養し生育状態を調べた。その結果を Table 9 に示した。

Cetane 1% の炭化水素培地では尿素濃度が 0.2% 以上必要と思われる。しかし、尿素 1.6% ではやや生育阻害の傾向がみられた。間瀬²⁴⁾ はパン酵母について、ブドウ糖を炭素源とした合成培地で尿素濃度の検討を行った結果、0.183% が最高であり、1.5% に達すると阻害作用があらわれることを報告している。

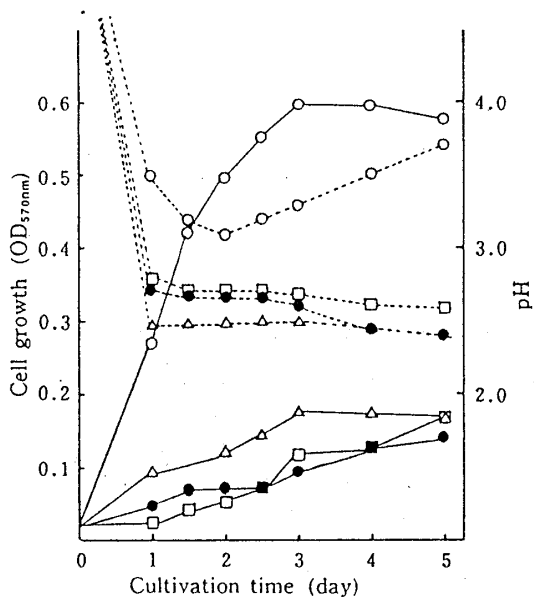


Fig. 1. Effect of various nitrogen sources on the growth of *Candida* sp. Y191.

—: Growth: pH
 ○ urea △ ammonium nitrate
 □ ammonium sulfate ● ammonium chloride

Table 9. Effect of urea concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

Urea concentration %	Initial pH	After 30 hrs		After 50 hrs	
		Dried cell yield mg/100 ml	Final pH	Dried cell yield mg/100 ml	Final pH
0.005	5.1	298.2	3.6	377.2	3.8
0.01	5.2	437.8	3.3	533.3	3.2
0.1	5.4	725.5	3.2	763.4	3.2
0.2	5.6	825.6	3.2	810.3	3.3
0.4	5.7	841.1	3.2	822.7	3.3
0.8	5.7	878.8	3.2	853.4	3.3
1.6	6.0	761.8	3.3	747.4	3.3

Table 10. Surfactants tested.

Surfactant	Composition
Tween 20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
Tween 40	Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate
Tween 60	Polyoxyethylene sorbitan monostearate
Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate
Tween 85	Polyoxyethylene sorbitan trioleate
Span 20	Sorbitan monolaurate
Span 40	Sorbitan monopalmitate
Span 60	Sorbitan monostearate
Span 80	Sorbitan monooleate
Span 85	Sorbitan trioleate

3) *Candida* sp. Y191 株の生育におよぼす界面活性剤の影響

炭化水素を炭素源とする培養では、界面活性剤の添加が炭化水素の分散をうながし、酵母による資化速度を増大させることが考えられる。本実験は Table 10 に示した非イオン界面活性剤10種類の影響について検討した。Table 2のB培地を基本培地として、これに界面活性剤0.01%を添加し、菌懸濁液1mlを接種し、28℃、4日間振盪培養し生育状態をしらべた。Fig. 2, Fig. 3にそれぞれ Tween系, Span系界面活性剤添加の影響を示した。

その影響は界面活性剤の種類によって

異なり、酵母の生育に好影響のあるもの、悪影響のあるものがあつたが、Span系の界面活性剤に効果のあるものが多かつた。Span 40, Span 80, Span 85などは生育速度を増大させ、Span 60, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, などは自己消化を早めたり、生育量を低下させるなどの悪影響がみられた。

つぎに、界面活性剤中効果のみられた

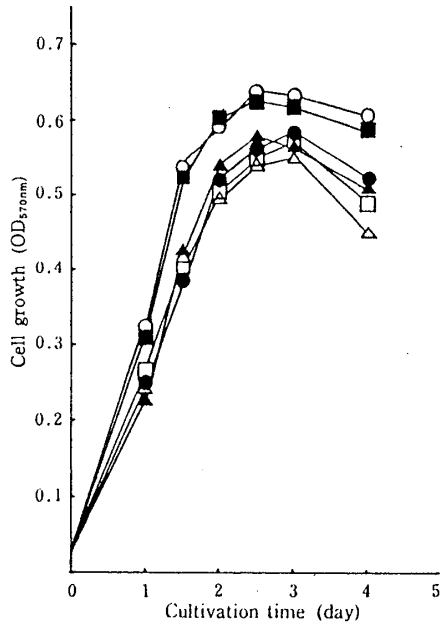


Fig. 2. Effect of various surfactants on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Control △ Tween 20 □ Tween 40
● Tween 60 ▲ Tween 80 ■ Tween 85

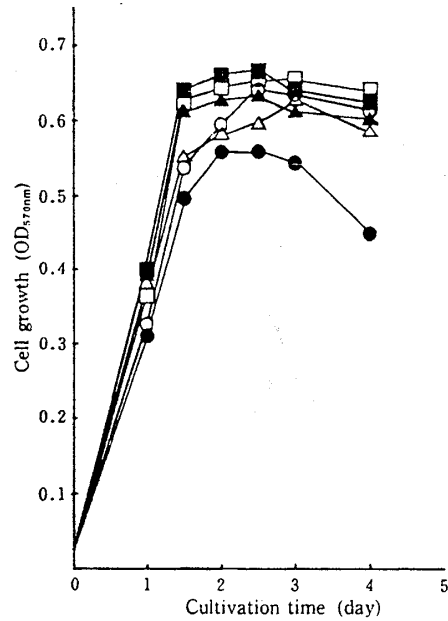


Fig. 3. Effect of various surfactants on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Control △ Span 20 □ Span 40
● Span 60 ▲ Span 80 ■ Span 85

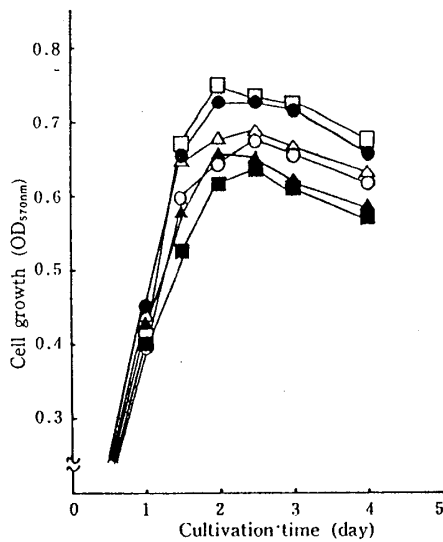


Fig. 4. Effect of Span 85 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Control △ 0.001% □ 0.005%
● 0.01% ▲ 0.02% ■ 0.04%

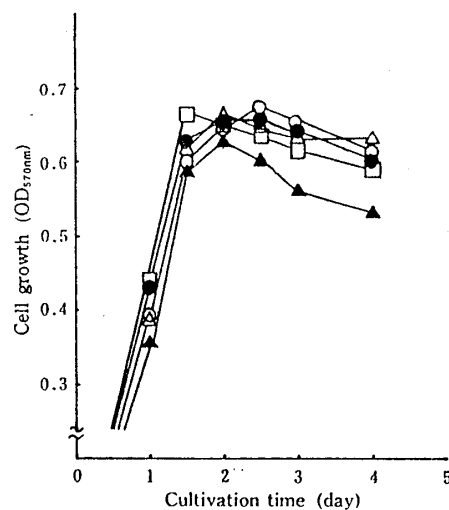


Fig. 5. Effect of Span 40 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Control △ 0.001% □ 0.01%
● 0.02% ▲ 0.04%

Span 40, Span 85および他の研究者^{12, 25, 26)}によって比較的よく使用されている Tween 20 の濃度について検討した。

Table 2 の B 培地に、界面活性剤を種々の濃度に添加して培地を調整し、28°C、4日間培養し生育状態を調べた。結果を Fig. 4～6 に示した。

Span 85は0.01%まで生育に効果的であったが、0.04%のような高い濃度のばあいにはかえって悪影響をおよぼした。Span 40は0.01%で生育促進効果がみられたが、高濃度では悪

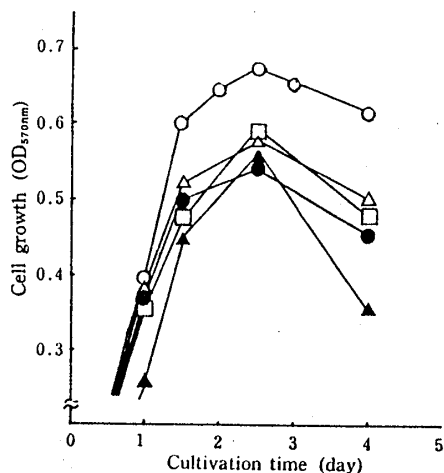


Fig. 6. Effect of Tween 20 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Control △ 0.001% □ 0.01%
● 0.02% ▲ 0.04%

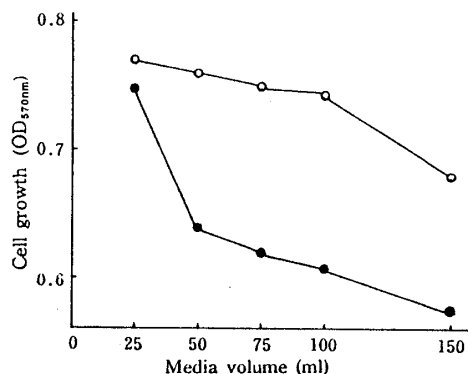


Fig. 7. Effect of media volume on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Span 85 added ● no surfactant

影響をおよぼした。Tween 20についての検討結果は、Fig. 6 に示すようにいずれの濃度においても、本菌の生育には好結果を与えなかった。

4) 培養液量の影響

炭化水素培地における培養は炭水化物培地における培養よりも多量の酸素を必要とするといわれている²⁷⁾。そこで *Candida* sp. Y 191 株の生育におよぼす培養液量の影響について検討した。Table 2 に示した培地 B を用い、Fig. 7 に示すように液量をかえて 25~150ml を 500 ml 容坂口フラスコに分注し、28℃、36 時間培養して生育状況を調べた。同時に、界面活性剤 Span 85 を 0.005% 添加したばあいの比較を試みた。

菌接種量はいずれの培養においても同一濃度（培養液 100ml 当り乾燥菌体重量として 10mg）になるよう接種した。結果は Fig. 7 に示した。

界面活性剤の影響が明白にあらわれ、無添加のばあいは培養液量 25ml で最高値を示し、液量の増加とともに急速に減少した。一方、Span 85 添加培地では、培養液量 100ml までは生育におよぼす影響はあまりなく、液量の増加による生育の低下が少なかった。

考 察

炭化水素資化性の強い酵母菌株を得るため、各種炭化水素を炭素源として酵母の検索を行った。その結果、炭化水素資化性の強い菌株は、*Mycotorula japonica* 316, *Mycotorula japonica* 6226, *Mycotorula japonica* 6229, *Candida tropicalis* 6019, *Candida tropicalis* 6263, *Candida tropicalis* 6264 と、四日市の油浸土壌からの分離酵母 Y 191 株であった。これらのうち Y 191 株は生育速度も速く、増殖量も多く、すぐれた結果を得た。

炭化水素の単体として、Cetane について検討したが、これらの選択株は非常に良好な生育をした。Cetane を炭素源として培養を行うと *M. japonica* 316, Y 191 株などのばあい培養

液のpHが極端に低下したが、培地の窒素源を硫酸アンモニウムから尿素にかえると、pHの極端な低下を防ぎ生育量が増大した。とくにY 191株は尿素の効果が顕著であり、Packed Cell Volumeが11.46ml/100mlに達した。高橋らは炭化水素資化性酵母の分離、検索、選択を行い、*Candida tropicalis* S 315Y 1菌を得ている。この株を用いてCetane 0.5%を炭素源として培養を行い、Packed Cell Volume 0.18ml/10mlを得ている¹²⁾。

油浸土壌から赤木が分離した *Candida* sp. Y 191株について各種窒素源、界面活性剤、培養液量の影響について検討した。

各種窒素源について、酵母の生育状態を検討した結果尿素は生育量がもっとも多く、培養中のpH低下が他の窒素源を用いた場合に比べて少ないことなどから適当であると思われる。尿素はパン酵母²⁸⁾、食飼料用酵母²⁹⁾、清酒酵母³⁰⁾、などの培養によく使用されている。また有馬らは *Pichia* sp. について、尿素と硝酸アンモニウムを窒素源として実験し、菌の生育に尿素が適していることを報告している。

尿素濃度の影響は、間瀬²⁴⁾が炭水化物培地を用いてパン酵母について行った実験と同様な傾向がみられ、尿素添加量が0.2~0.8%が適当で1.6%になると生育阻害がみられた。

各種界面活性剤、培養液量について、まず多くの研究者によって論議されている界面活性剤の種類とその濃度について検討した。Span系界面活性剤5種、Tween系界面活性剤5種の計10種類中、Span 85が *Candida* sp. Y 191株の生育に良好な影響をおよぼし、その濃度は0.005~0.01%が適当であることを認めた。他にSpan 40、Span 80が比較的良好な結果を示した。酵母の培養によく用いられる^{12, 25, 26)} Tweenは本菌に対しては好結果がえられなかった。合葉ら²⁹⁾はTween 20が酵母増殖を抑制する傾向があることを報告し、藤井ら⁷⁾はTween 20を添加した培地を用いて *Corynebacterium simplex* の培養を行い、害作用のみがあらわれたことを報告している。将来、炭化水素からの菌体生産を考えるにあたっては、*Candida* sp. Y 191株の場合、Span 85の添加は培養時間の短縮、酵母菌体の増収に効果的と考えられる。培養液量を変化させた実験において、培養液量の多いばあいには、とくにSpan 85を添加した培地の方が生育度が高く、添加しない培地と顕著な差が認められた。田中ら¹³⁾は *Candida albicans* を培養し、炭化水素の乳化度が通気量よりも酵母生育の調整因子となることを示唆している。本実験においても同様な傾向がみられた。Span 85の添加は本菌の培養効率の向上につながると思われる。

要 約

各種の炭化水素を炭素源とした培地を用いて、309株の供試菌(同定株133株、未同定の分離株176株)から炭化水素資化性の強い菌株を選択した。その結果、*M. japonica* 316、*M. japonica* 6226、*M. japonica* 6229、*C. tropicalis* 6019、*C. tropicalis* 6263、*C. tropicalis* 6264、土壌からの分離母Y 191株の7菌株を得た。

Y 191株、*M. japonica* 316はCetaneを炭素源とする培地でとくによい生育をしたが、窒

素源として硫酸アンモニウムを使用したばあいは培地の pH が極端に低下した。硫酸アンモニウムのかわりに尿素を用いると、培養による pH の極端な低下が防止でき、生育量も増大した。Y 191 株においてとくに生育量の増大が顕著であった。

つぎに、赤木によって四日市市の油浸土壌から分離された炭化水素資化性の強い Y 191 号菌 (*Candida* sp. に属する) の生育におよぼす種種の窒素源、界面活性剤などの影響を検討した。窒素源としては尿素が適当であり、その濃度は 0.2~0.8% が良好であった。供試した 10 種類の界面活性剤のうち、*Candida* sp. Y 191 株の生育に効果があったものは、Span 40, Span 80, Span 85 であった。中でも Span 85 がもっとも効果的であり、その適量は 0.005~0.01% であった。また、培養フラスコ中の培養液量の増加とともに、一定量の培地からの菌体収量は減少した。しかし、Span 85 の添加により、収量の減少は大幅に防止できた。

文 献

- 1) M. MIYOSHI : *Jharb. Wiss. Botan.*, **28**, 269 (1895)
- 2) O. RAHN : *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II*, **16**, 382 (1906)
- 3) K. STORMER : *ibid.*, **20**, 282 (1908)
- 4) G. M. KNEBEL : *Bull. Am. Assoc. Geologists*, **30**, 1935 (1946)
- 5) 井口 喬, 早川司郎, 武田 勲 : *農化*, **40**, 26 (1966)
- 6) 田中渥夫, 福井三郎 : *醸酵工学*, **45**, 611 (1967)
- 7) 藤井克彦, 清水祥一, 福井三郎 : *醸酵工学*, **44**, 185 (1966)
- 8) C. RATLEDGE : *Biotech. Bioeng.*, **10**, 511 (1968)
- 9) M. MIZUNO, Y. SHIMOJIMA, T. IGUCHI, I. TAKEDA, S. SENOH : *Agric. Biol. Chem.* **30**, 506 (1966)
- 10) 原田篤也, 吉村 正 : *醸酵工学*, **42**, 615 (1964)
- 11) I. TANABE, J. OKADA, H. ONO : *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1175 (1966)
- 12) J. TAKAHASHI, Y. KAWABATA, K. YAMADA : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 292 (1965)
- 13) A. TANAKA, H. MAKI, S. FUKUI : *J. Ferment. Technol.*, **45**, 1156 (1967)
- 14) M. DOSTALEK, U. MUNK, O. VOLTVA, K. PECKA : *Biotech. Bioeng.*, **10**, 33 (1968)
- 15) T. L. MILLER, S. LIE, M. J. JOHNSON : *Biotech. Bioeng.*, **6**, 299 (1964)
- 16) 相田徳二郎, 山口和夫 : *農化*, **40**, 119 (1966)
- 17) A. J. MARKOVETZ, R. E. KALLIO : *J. Bacteriol.*, **87**, 968 (1964)
- 18) A. CHAMPAGNAT, C. VERNET, B. LAINE, J. FILOSA : *Nature*, **197**, 13 (1963)
- 19) I. TAKEDA, T. IGUCHI, T. KAWAMURA, S. HORIGUCHI, S. HAYAKAWA, S. SENOH : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 766 (1965)
- 20) 武田 勲 : *醸協誌*, **24**, 443 (1966)
- 21) 飯塚 廣, 瀬戸尚美 : *石油醸酵*, 幸書房, p.43 (1970)
- 22) 榎田淑郎 : *微生物タンパク質の開発*, 講談社 (1981)
- 23) 赤木盛郎, 山路 正, 高橋 勤 : *昭和44年度日本農芸化学会大会講演要旨集*, p.184
- 24) 間瀬泰男 : *醸酵工学*, **32**, 176 (1954)

- 25) K. SHIMAHARA, H. YAMASHITA : *J. Ferment. Technol.*, **45**, 1172 (1967)
- 26) A. TANAKA, S. SHIMIZU, S. FUKUI : *J. Ferment. Technol.* **46**, 461 (1968)
- 27) W. A. DARLINGTON : *Biotech. Bioeng.*, **6**, 241 (1964)
- 28) S. C. PRESCOTT, C. G. DUNN : *Industrial Microbiology*, 3rd ed., McGraw-Hill Book Co. Inc., New York (1959)
- 29) 合葉修一, 洪 桂林, 染谷淳一郎 : 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p.95 (1968)
- 30) K. ARIMA, S. OGINO, K. YANO, G. TAMURA : *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 1004 (1965)