

炭化水素資化性酵母 *Candida* sp. Y-191 の培養条件*¹

赤木盛郎・福永峰子・山路 正*²

坪内一夫*³・江嶋正之*⁴

Cultural Condition of Hydrocarbon Assimilating Yeast, *Candida* sp. Y-191

Morio AKAKI, Mineko FUKUNAGA, Tadashi YAMAJI,
Kazuo TSUBOUCHI and Masayuki EJIMA

In the previous paper,¹⁾ screening of yeast that assimilate hydrocarbons and the effects of various nitrogen sources and surfactants on the growth of hydrocarbon assimilating yeast, *Candida* sp. Y-191, which had been isolated from oily soil by M. Akaki, one of the authors, were investigated. The basal medium containing 1% n-Hexadecane as carbon source was used.

In this report, the effects of concentration of n-Hexadecane in the medium and the addition of natural nutrients to the basal medium such as yeast extract, meat extract, koji extract, corn steep liquor and peptone, on the growth of *Candida* sp. Y-191, were investigated in shaking culture, using the basal medium (n-Alkane, (NH₂)₂CO 1.4g, KH₂PO₄ 2.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, Yeast extract 0.2g, Span 85 0.005g, Distilled water 1000ml, pH5.5 ~ 6.0). Also the ability of assimilation of individual pure n-Alkanes (n-C₈~n-C₁₈) by the yeast were investigated. Following results were obtained.

As shown in Table 2, the yield of the yeast cell on the basis of added n-Hexadecane increased, together with the decrease of n-Hexadecane concentration in the medium. The yield reached 90.5% with the medium containing 0.5% n-Hexadecane. The yield of the yeast cell on the basis of a definite amount of the medium was maximum, with the medium containing 2% n-Hexadecane.

This yeast strain was able to grow comparatively well in the n-Hexadecane containing synthetic medium without addition of natural nutrients. However, by the addition of natural nutrients such as yeast extract, meat extract and corn steep liquor, the yeast grew abundantly. The addition of 0.01% yeast extract to the medium was effective for the yeast growth.

As shown in Table 3, the yeast assimilated hydrocarbons of n-Alkanes, n-C₉ to n-C₁₈ and especially n-C₁₆, n-C₁₇ and n-C₁₈ with good cell production. The yield of yeast cell generally tended to increase with increment of carbon number of n-Alkanes tested.

-
- * 1 炭化水素資化性酵母に関する研究 (第2報)
Studies on Hydrocarbon Assimilating Yeast Part 2.
 - * 2 興和株式会社
 - * 3 三重県工業技術センター
 - * 4 明治乳業株式会社研究所

緒 言

前報¹⁾で、同定株133株、未同定株176株合せて309株を供試菌として炭化水素資化性酵母の検索を行い、*Candida* 属 7 株、*Mycotorula* 属 3 株、*Pichia* 属 6 株、*Hansenula* 属 6 株、未同定株 4 株の計26株を選択した。なかでも著者の一人、赤木が四日市市の油浸土壌から分離した *Candida* sp. Y-191号菌²⁾は増殖速度、菌体収量ともにすぐれていることを認めた。また、この分離酵母の生育におよぼす各種窒素源、界面活性剤等の影響についても報告した。

本報では、*Candida* sp. Y-191の生育におよぼす炭化水素濃度の影響、天然栄養源添加の効果と本菌の各種 n-Alkane の資化能などについて検討した結果を報告する。

実験方法

培養方法としては、供試菌株 *Candida* sp. Y-191を前報に準じて馴養培養、前培養を行い、遠心分離で集菌、水洗後、無菌水に懸濁して接種した。接種量は、菌懸濁液の O. D. (Optical Density) を測定して、菌濃度が一定になる様調整した。培地は次に示したものを基本培地として用いた。

基本培地：n-Alkane, (NH₂)₂CO 1.4g, KH₂PO₄ 2.5g, MgSO₄ · 7H₂O 1.0g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, Yeast extract 0.2g, Span85 0.005g, Distilled water1000ml, pH 5.5~6.0

なお、n-Alkane は殺菌せずに添加し、尿素は 5 % 液を調製し殺菌して添加した。

培地100ml を500ml 容板口フラスコに分注、一定量の菌懸濁液を接種した。培養は28℃で所定時間振盪培養した。振盪条件は振幅60mm, 振盪数124回/分とした。

菌の生育量の測定は、培養後、1ml の培養液を、3500rpm, 10分間遠心分離し、菌体を2ml の n-Hexane で洗浄し、ついで水で洗浄した後、25ml の水に懸濁し、570nm における O. D. を測定した。また、乾燥菌体重量は、予め恒量を求めた秤量ビンにとり、110℃で乾燥、恒量を

Table. I n-Alkanes tested.

n-Alkane	Molecular formula	Molecular weight	Melting point	Boiling point	Density
n-Octane	C ₈ H ₁₈	114.23	-56.8°C	125.7°C	0.703
n-Nonane	C ₉ H ₂₀	128.25	-53.5	120.8	0.718
n-Decane	C ₁₀ H ₂₂	142.28	-29.7	174.1	0.730
n-Undecane	C ₁₁ H ₂₄	156.30	-25.6	195.9	0.740
n-Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	170.33	-9.6	216.3	0.750
n-Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	184.36	-6.2	234.0	0.757
n-Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198.38	-5.4	235.4	0.764
n-Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212.41	9.9	270.6	0.768
n-Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226.44	18.2	286.8	0.775
n-Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	240.46	22.0	301.8	0.777
n-Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	254.49	28.2	317.0	0.777

求めた。

n-Alkane は Table 1 に示した 11 種類の市販特級試薬を使用した。

実験結果および考察

1. n-Hexadecane 濃度の生育に及ぼす影響

前記基本培地の n-Alkane として n-Hexadecane を用い、0.5~4.0% と種類の濃度に添加して培地を調製し、菌懸濁液を接種、28℃ で 30~48 時間培養し生育状態を調べた。培養結果を Table 2 に示した。

Table. 2 Effect of n-Hexadecane concentration on the growth of *Candida* sp. Y-191.

n-Hexadecane concentration W/V %	After 30 hrs		After 48 hrs	
	Dried cell mg/100 ml	Cell yield on added n-Hexadecane %	Dried cell mg/100 ml	Cell yield on added n-Hexadecane %
0.5	452.4	90.5	432.1	86.4
1.0	632.3	63.2	825.1	82.5
2.0	991.5	49.6	1073.3	53.7
4.0	641.1	16.0	785.2	19.6

酵母収量は n-Hexadecane の添加量とともに増大したが、4.0% 添加では減少の傾向がみられた。収率（給与炭素源に対する乾燥菌体重量、%）は n-Hexadecane 濃度が低い程高い値を示した。n-Hexadecane 2% で *Candida* sp. Y-191 の酵母収量は最も多かったが、収率は 53.7% であった。n-Hexadecane 0.5% では収率 90.5%（Assimilation ratio 106.5%）の高い値を示した。田中ら³⁾は n-Hexadecane 濃度 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% の培地に *Candida albicans* を培養し、それぞれ Assimilation ratio（給与炭素源の炭素重量に対する乾燥菌体重量、%）89.4, 58.7, 30.8, 13.5% を報告している。Miller ら⁴⁾は *Candida intermedia* を n-Hexadecane 1% を含む培地に培養し、収率 82% を報告し、また Glucose を含む培地に同菌を培養し、収率 35% を報告している。*Candida* sp. Y-191 についても同様の傾向がみられ、炭化水素培地における収率は炭水化物培地における収率よりも高く、効率的菌体生産が期待される。分離菌株 *Candida* sp. Y-191 はこれらの報告よりも高い収率を示し、菌体生産にとって有望と考えられる。

2. 天然栄養源の添加効果

1) 各種天然栄養源の効果

Yeast extract, Meat extract, Corn steep liquor, Peptone, Koji extract など 5 種類の栄養源の本菌の生育におよぼす効果を検討した。前記の基本培地の n-Alkane として n-Hexadecane を用い、Yeast extract 0.02% にかえて、5 種類の天然栄養源をそれぞれ 0.01% 添加して培地

を調製し、菌懸濁液を接種し、28℃で4日間振盪培養し、生育状態を調べた。培養結果は Fig. 1 に示した。

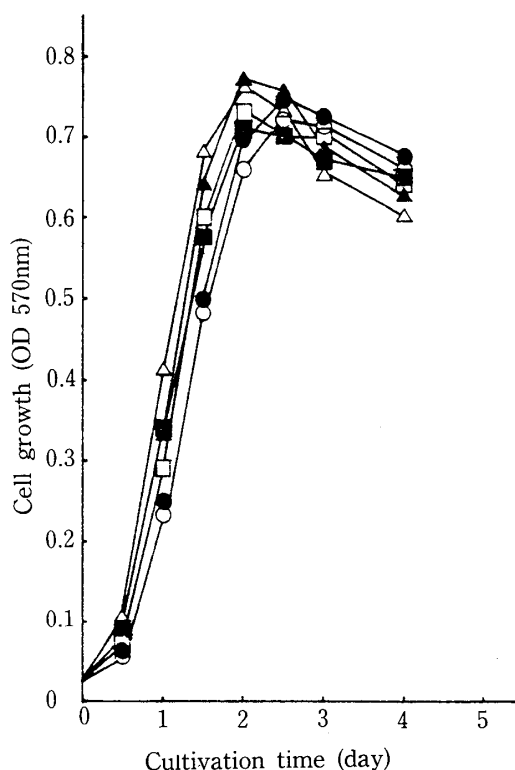


Fig.1. Effect of natural nutrient on the growth of *Candida* sp. Y-191.

○—○ control △—△ yeast extract
 □—□ meat extract ●—● koji extract
 ▲—▲ corn steep liquor ■—■ peptone

Candida sp. Y-191は天然栄養源なしでもよく生育するが、供試した天然栄養源はいずれも本菌の生育に効果的であった。なかでも、Yeast extract, Corn steep liquor が特に有効であった。

2) Yeast extract 濃度の影響

効果のすぐれていた Yeast extract について、その添加量の影響を調べた。前記基本培地の n-Alkane として n-Hexadecane 1%を用い、Yeast extract を0.0001~0.1%添加した培地を調製し、菌懸濁液を接種し、28℃で60時間振盪培養して経時的に生育状態を調べた。培養結果を Fig. 2に示した。

Yeast extract は0.01%以上で生育促進効果が明白に認められた。

Candida sp. Y-191は天然栄養源を含まない基本培地のみでもよく生育できるが、天然栄養源の添加により、特に生育速度の増大がみられた。Yeast extract 濃度については0.01%で効果的であった。Arima ら⁵⁾は *Pichia* sp. を用い Corn steep liquor について、Yamada ら⁶⁾は *Candida tropicalis* を用い Yeast extract, Corn steep liquor, Meat extract, Peptone, Koji extract につ

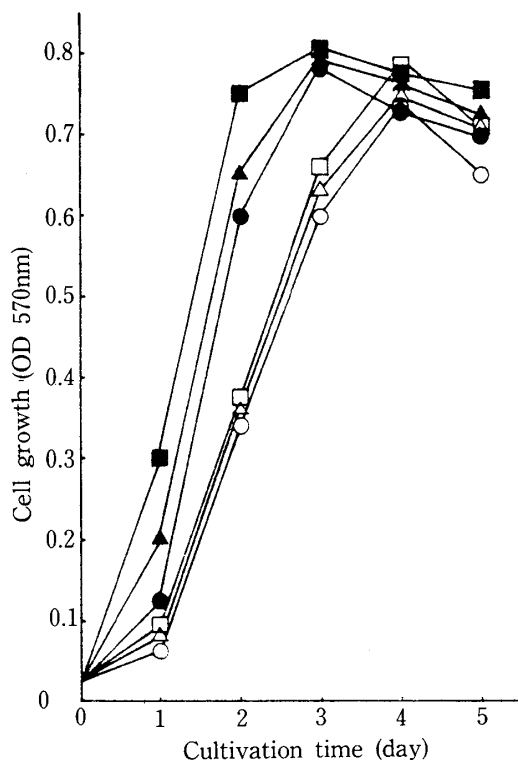


Fig. 2. Effect of yeast extract concentration on the growth of *Candida* sp. Y-191.

○—○ control △—△ 0.0001%
 □—□ 0.001% ●—● 0.01%
 ▲—▲ 0.02% ■—■ 0.1%

いて影響を検討し、それぞれ誘導期の短縮に効果があったと報告している。*Candida* sp. Y-191の場合も同様の傾向がみられた。

3. *Candida* sp. Y-191の各種 n-Alkane の資化性

前記基本培地の n-Alkane として Table 1 に示した C₈~C₁₈ のものを用い、それぞれを 2% 添加して培地を調製し、28℃で30~48時間振盪培養して菌の生育状態を調べ、個々の炭化水素の資化性を検討した。培養結果は Table 3 に示した。

供試した n-Alkane は n-Octane を除いて、すべて *Candida* sp. Y-191 によって利用された。酵母収量は炭素数の増加とともに増加する傾向があり、特に n-Hexadecane, n-Heptadecane, n-Octadecane がよく資化された。

酵母菌による n-Alkane の資化性に関しては多くの研究報告がある。Takeda ら⁷⁾ は *Candida* sp., *Torulopsis* sp., *Brettanomyces* sp. を用いて C₁₁~C₂₂ の n-Alkane について検討し、*Candida* sp. と *Torulopsis* sp. は n-Tetradecane, n-Pentadecane n-Hexadecane を特によく資化し、*Brettanomyces* sp. は n-Tetradecane, n-Pentadecane, n-Hexadecane よりも n-Decane を特によく資化することを報告している。Mizuno ら⁸⁾ は *Candida Petrophilum* を用いて C₉~C₁₈ の n-Alkane について検討し、n-Tetradecane, n-Pentadecane, n-Hexadecane, n-Heptadecane を特によく資化することを、Yamada ら⁶⁾ は *Candida tropicalis* を用い C₅~C₂₂ の n-Alkane について検討し、n-Pentadecane, n-Hexadecane, n-Heptadecane, n-Octadecane, n-Nonadecane

Table. 3 Cell yield of *Candida* sp. Y-191 on the medium containing n-Alkane.

n-Alkane	After 30 hrs		After 48 hrs	
	Dried cell mg/100ml	Cell yield on added n-Alkane %	Dried cell mg/100ml	Cell yield on added n-Alkane %
control	28.0	—	18.0	—
n-Octane	13.4	0.7	13.1	0.7
n-Nonane	307.0	15.4	399.2	20.0
n-Decane	324.2	16.2	414.4	20.7
n-Undecane	340.7	17.0	433.0	21.7
n-Dodecane	366.3	18.3	634.3	31.7
n-Tridecane	409.9	20.4	579.9	29.0
n-Tetradecane	538.7	26.9	775.3	38.8
n-Pentadecane	708.0	35.4	1155.2	57.8
n-Hexadecane	1001.5	50.1	1593.3	79.7
n-Heptadecane	1068.1	53.4	1670.6	83.5
n-Octadecane	1088.2	54.4	1464.5	73.2

を特によく資化することを報告している。また Miller ら⁴⁾は *Candida intermedia* を用いて C₁₂ ~ C₁₈ の n-Alkane について検討し, n-Tetradecane, n-Hexadecane, n-Octadecane をよく資化することを, 相田ら⁹⁾は *Mycotorula japonica* を用いて C₉ ~ C₁₆ の n-Alkane について検討し, 炭素数の増加とともによく資化され, 特に n-Hexadecane をよく資化することを, Tanaka ら¹⁰⁾は *Candida albicans* を用いて C₆ ~ C₂₀ の n-Alkane について検討し, n-Decane, n-Undecane, n-Dodecane を特によく資化することを, Arima ら⁵⁾は *Pichia* sp. を用いて C₉ ~ C₁₃ の n-Alkane について実験し, n-Decane, n-Undecane, n-Dodecane, n-Tridecane をよく資化することをそれぞれ報告している。これらの研究報告から, *Candida* 属には n-Pentadecane, n-Hexadecane 付近の n-Alkane をよく資化するものが多い。

本研究に用いた *Candida* sp. Y-191 は, Table 3 に示したように広い範囲の n-Alkane の資化能をもち, 特に n-Hexadecane, n-Heptadecane, n-Octadecane によく生育することが認められた。したがってこれらの炭化水素を比較的多く含んでいる軽油等の利用が有利と考えられる。

摘 要

前報で, 同定株, 未同定株合せて309株を供試菌として炭化水素資化性酵母の検索を行い, 26株の酵母を選択した。その中でも赤木が四日市市の油浸土壌から分離した *Candida* sp. Y-191号菌は増殖速度, 菌体収量などの点ですぐれていることを認めたので, 本報では *Candida* sp. Y-191についてその生育におよぼす n-Hexadecane 濃度の影響, 種類の天然栄養源添加の効果および本菌の各種 n-Alkane の資化性について検討した。n-Hexadecane 濃度は低い程菌体収率が高く0.5%濃度では90.5%に達した。また, 最高生育量を得たのは2.0%であった。

本菌は天然栄養源の添加なしでもよく生育したが, Yeast extract, Corn steep liquor, Meat

extract, Peptone 等の添加によって生育速度が増大した。Yeast extract は0.01%で効果的であった。

11種類の n-Alkane (C₈~C₁₈) の資化性は、炭素数の増大とともに酵母量が増大する傾向がみられた。特に C₁₆~C₁₈ の n-Alkane を基質とした場合酵母収量が多かった。

文 献

- 1) 赤木盛郎, 福永峰子, 山路正, 高橋勤, 坪内一夫, 辻井邦世, 谷山美子: 鈴鹿短大紀要, 第7巻, 21 (1987)
- 2) 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
- 3) A. TANAKA, H. MAKI, S. FUKUI: *J. Ferment. Technol.*, **45**, 1156 (1967)
- 4) T. L. MILLER, S. LIE, M. J. JOHNSON: *Biotech. Bioeng.*, **6**, 299 (1964)
- 5) K. ARIMA, S. OGINO, K. YANO, G. TAMURA: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 1004 (1965)
- 6) J. TAKAHASHI, Y. KAWABATA, K. YAMADA: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 292 (1965)
- 7) I. TAKEDA, T. IGUCHI, T. KAWAMURA, S. HORIGUCHI, S. HAYAKAWA, S. SENOH: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 796 (1965)
- 8) M. MIZUNO, Y. SHIMAJIMA, T. IGUCHI, I. TAKEDA, S. SENOH: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 506 (1969)
- 9) 相田徳二郎, 山口和夫: 農化, **40**, 119 (1966)
- 10) A. TANAKA, S. FUKUI: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 214 (1968)