

## 炭化水素を炭素源とする酵母の生産に関する研究 (第2報) : 培養条件の検討 (1)

著者	赤木 盛郎, 山路 正, 坪内 一夫, 高橋 勤
雑誌名	三重大學農學部學術報告 = The bulletin of the Faculty of Agriculture, Mie University
巻	66
ページ	199-204
発行年	1983-03-01
その他のタイトル	Studies on Yeast Production from Hydrocarbons Part 2. : Cultural Conditions of Candida sp. Y 191 (1)
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10076/3412">http://hdl.handle.net/10076/3412</a>

## 炭化水素を炭素源とする酵母の生産に関する研究 (第2報)

## 培養条件の検討 (1)

赤木盛郎・山路 正\*・坪内一夫\*\*・高橋 勤\*\*\*

## Studies on Yeast Production from Hydrocarbons

Part 2. Cultural Conditions of *Candida* sp. Y191 (1)

Morio AKAKI, Tadashi YAMAJI, Kazuo TSUBOUCHI and Tsutomu TAKAHASHI

## 緒 言

前報<sup>1)</sup>で、当研究室保存の酵母菌株 *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Mycotorula*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* 属の酵母および、当研究室で分離されたキシロース資化性酵母、ラクトース資化性酵母や亜硫酸パルプ廃液、アルコール蒸留廃液、油浸土壌、外国の土壌、清酒工場等から分離された菌株について、炭化水素資化能を調べ、資化性の高い7株菌（分離酵母, *Mycotorula japonica*, *Candida tropicalis*）を選択した。このうちで、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. Y191<sup>2)</sup> は増殖速度、増殖量ともすぐれていることを認めた<sup>1)</sup>。

本報では、この分離酵母 *Candida* sp. Y191 を供試菌として、各種窒素源、界面活性剤その他の酵母生育におよぼす影響について検討した結果を報告する。

## 実 験 方 法

## 1. 培養方法

供試菌株 *Candida* sp. Y191 は Kerosene と Liquid paraffine を炭素源とした寒天斜面培地<sup>1)</sup>で 30°C, 5日間培養して馴養した。前培養、本培養の培地組成を Table 1 に示した。

前培養は、500ml 容坂口フラスコに Table 1 の A 培地 100ml/ を分注、滅菌後、馴養した斜面より 3 白金耳

Table 1. Composition of medium.

	Medium A	Medium B
Cetane*	10.0 g	10.0 g
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO**	1.4	1.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5	2.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0	1.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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.

接種し、28°C, 2日間振盪培養（振幅 60mm, 振盪数124回/分、以後の振盪条件はすべて同様）した。

培養後、増殖した菌体を遠心分離（3500r. p. m., 10分間、以後の遠心条件はすべて同様）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為、この菌懸濁液の一定量を希釈して、570nm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。

本培養は 500ml 容坂口フラスコに、Table 1 の 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。培養液量は特にことわらないかぎり 100ml/ とし、28°C で所定時間振盪培養した。

昭和57年10月30日 受理

\* 現在興和株式会社

\*\* 現在三重県工業技術センター

\*\*\* 現在江南女子短期大学

## 2. 生育量の測定

培養後、1 ml の培養液を遠心分離し、菌体を 2 ml の n-Hexane で洗浄し、ついで 2 ml の水で洗浄した後、25 ml の水に懸濁し、570 nm における O. D. を測定した。また同時に乾燥菌体重量も測定した。*Candida* sp. Y 191 の乾燥菌体重量と O. D. の関係を Fig. 1 に示した。

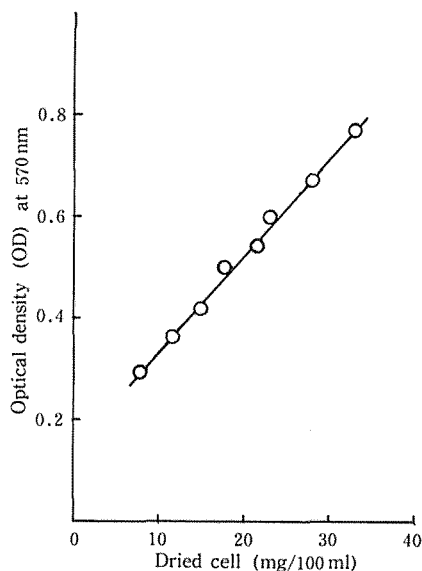


Fig. 1. Relationship between optical density and dried cell weight of *Candida* sp. Y191.

## 実験結果

### 1. 窒素源の影響

#### 1) 各種窒素源の影響

Table 1 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% となる様に添加した培地

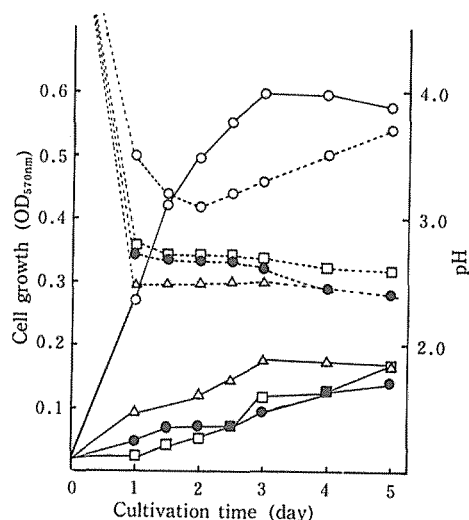


Fig. 2. Effect of various nitrogen sources on the growth of *Candida* sp. Y191.

——: Growth .....: pH

○ urea △ ammonium nitrate

□ ammonium sulfate ● ammonium chloride

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。窒素源としては尿素、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウムを用いた。生育状況と pH の変化を Fig. 2 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、尿素培地以外は 3 以下に低下した。しかし、尿素培地では 3~4 の間までの低下におさえられた。

#### 2) 尿素濃度の影響

前実験で良好な結果を示した尿素について、適当な濃

Table 2. 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

度を求める為、以下の実験を行った。Table 1 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 1ml 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 2 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<sup>3)</sup> 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。

## 2. 界面活性剤の影響

### 1) 各種界面活性剤の影響

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促進し、発酵速度を増大させることが考えられる。本実験は Table 3 に示した10種類の非イオン性界面活性剤の影響について検討した。Table 1 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°C、4日間振盪培養し生育状態を調べた。Tween 系界面活性剤添加の影響を Fig. 3 に、Span 系のそれを Fig. 4 に示した。

界面活性剤の添加の影響はその種類によって異なり、生育に好影響のあるもの、悪影響のあるものがあったが、Span 系の界面活性剤に効果のあるものが多かった。Span 40, Span 80, Span 85 等は生育速度を増加させ、Span 60, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 等は自己消化を早めたり、生育量を低下させる等の悪影響がみられた。

Table 3. 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

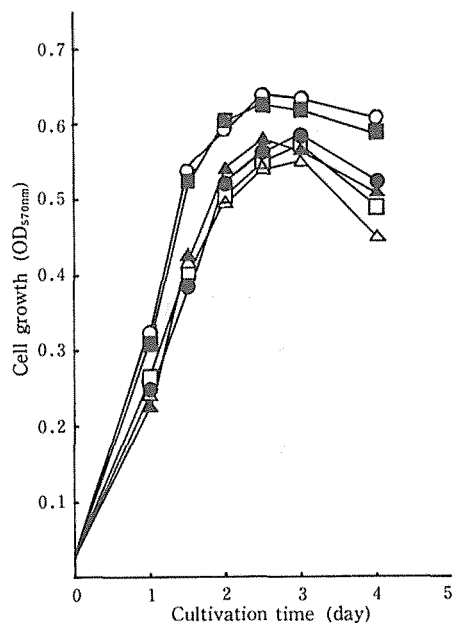


Fig. 3. Effect of various surfactants on the growth of *Candida* sp. Y191.

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

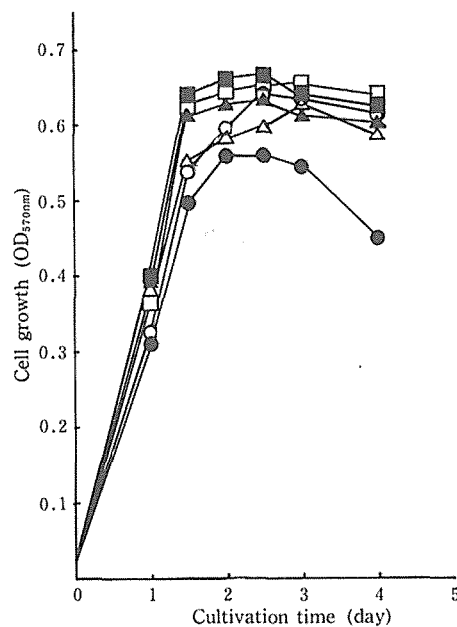


Fig. 4. Effect of various surfactants on the growth of *Candida* sp. Y191.

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

## 2) 界面活性剤濃度の影響

前実験で効果のみられた Span 40, Span 85 および他の研究者<sup>4-6)</sup>によって、比較的良好に使われている Tween 20 の濃度について検討した。前記の Table 1 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製し、

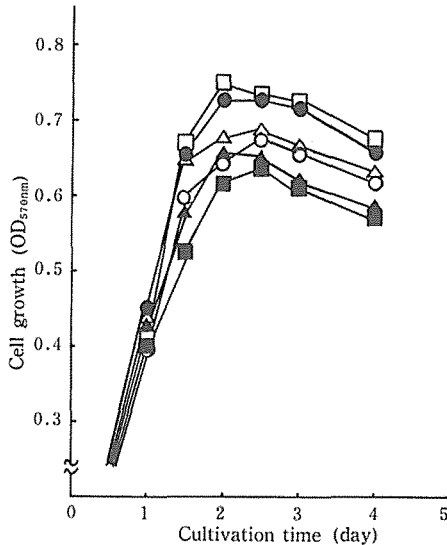


Fig. 5. Effect of Span 85 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

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

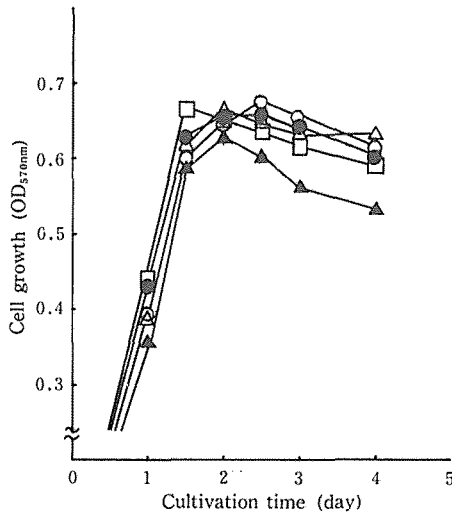


Fig. 6. Effect of Span 40 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

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

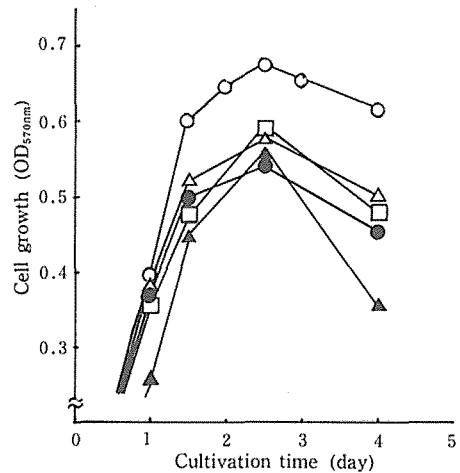


Fig. 7. Effect of Tween 20 concentration on the growth of *Candida* sp. Y191.

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

28°C, 4日間培養し生育状態を調べた。結果を Fig. 5~7 に示した。

Span 85 は 0.01%まで生育に効果的であったが、0.04%の様な高濃度の場合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、高濃度では悪影響をおよぼした。Tween 20 についても検討したが、Fig. 7 に示す様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。

## 3. 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<sup>7)</sup>。そこで生育におよぼす培養液量の影響について検討した。Table 1 の B 培地を用い、500ml 容坂口フラスコに液量をかえて、Fig. 8 に示す様に 25~150ml を分注し、28°C, 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%添加した場合との比較を試みた。菌の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）になる様接種した。その結果を Fig. 8 に示した。

界面活性剤の影響が明白にあらわれた。無添加の場合は培養液量 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。

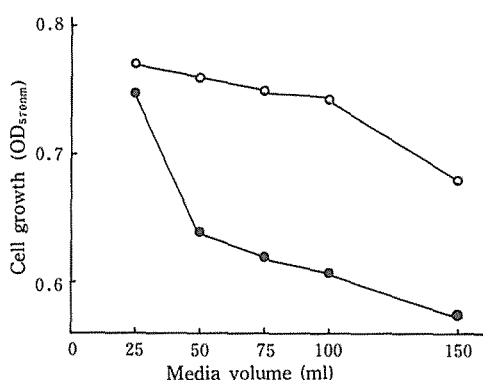


Fig. 8. Effect of media volume on the growth of *Candida* sp. Y191.

○ Span 85 added ● no surfactant

## 考 察

### 窒素源の影響について

各種窒素源について酵母の生育状態を検討した結果、尿素は酵母の生育量が最も多く、培養中の pH 低下が他の窒素源に比べて少ないこと等から適当であると思われる。尿素はパン酵母、食飼料用酵母<sup>8)</sup>、清酒酵母<sup>9)</sup>等の培養によく使用されている。また、有馬<sup>10)</sup>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<sup>3)</sup>が炭水化物培地を用い、パン酵母について行った実験と同様の傾向がみられ、尿素添加量が 0.2~0.8% が適当であり、1.6% になると生育阻害がみられた。

### 界面活性剤、培養液量の影響について

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. Y191 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<sup>4-6)</sup> Tween 20 は本菌に対しては好結果が得られなかった。合葉ら<sup>9)</sup>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<sup>11)</sup>は Tween 20 を添加した培地で *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、炭化水素からの酵母製造を考えるにあたっては、*Candida* sp. Y191 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、培養液量の多い場合には、特に 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<sup>12)</sup>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を示した。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

著者の一人赤木によって、油浸土壌から分離された炭化水素資化性菌 *Candida* sp. Y191 の生育におよぼす、種類の窒素源、界面活性剤などの影響を調べた。

1) 窒素源としては尿素が適当であり、その濃度は 0.2~0.8% であった。

2) 供試した界面活性剤のうち、本菌の生育に効果があったものは、Span 40, Span 80, Span 85 であった。その中で Span 85 が最も効果的であり、その濃度は 0.005~0.01% であった。

3) 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酵母収量は減少した。しかし、Span 85 を添加することにより、この減少は大いに防止された。

## 文 献

- 1) 赤木盛郎, 坪内一夫, 辻井邦世, 谷由美子: 三重大農学報, 第63号, 217 (1981)
- 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) 間瀬泰男: 醸工, 32, 176 (1954)
- 4) K. Shimahara, H. Yamashita: *J. Ferment. Technol.*, 45, 1172 (1967)
- 5) A. Tanaka, S. Shimizu, S. Fukui: *J. Ferment. Technol.*, 46, 461 (1968)
- 6) J. Takahashi, Y. Kawabata, K. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 292 (1965)
- 7) W. A. Darlington: *Biotech. Bioeng.*, 6, 241 (1964)
- 8) S. C. Prescott, C. G. Dunn: *Industrial Microbiology*, 3rd ed., McGraw-Hill Book Co. Inc., New York (1959)
- 9) 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)
- 10) K. Arima, S. Ogino, K. Yano, G. Tamura: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 1004 (1965)
- 11) 藤井克彦, 清水祥一, 福井三郎: 醸工, 44, 185 (1966)
- 12) A. Tanaka, H. Maki, S. Fukui: *J. Ferment. Technol.*, 45, 1156 (1967)

### Summary

The effects of various nitrogen sources and surfactants on the growth of hydrocarbon utilizing yeast strain, *Candida* sp. Y 191, which had been isolated from oily soil by M. Akaki, one of the authors, were investigated in shaking culture on the basal medium B containing 1 per cent cetane as carbon source.

The results obtained were as follows.

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 3 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.