

Rhodotorula minuta の生育およびカロチノイド生成 に及ぼす培養条件の影響

多田幹郎・白石正英

(生物化学研究室)

Received June 30, 1977

Effects of Culture Conditions on the Growth and Carotenoid Formation in *Rhodotorula minuta*

Mikiro TADA and Masahide SHIROISHI

(Laboratory of Biological Chemistry)

Effects of sugar as a carbon source, amino acid as a nitrogen source and vitamin on the growth of *Rhodotorula minuta* and its carotenoid formation were studied. The effect of light was also investigated.

1) Glucose, mannose and sucrose were good carbon sources for the growth, but fructose, maltose and lactose were not assimilated.

2) Most of amino acids, except L-leucine, L-isolecine, L-cysteine and L-methionine were utilized as nitrogen sources for the growth. The carotenoid formation was depressed to some extent by the use of L-histidine and L-threonine as nitrnogen sources.

3) Thiamine was essential for the growth of *Rh. minuta*. The addition of *p*-aminobenzoic acid to the thiamine medium brought the more stimulation of the growth and the more acceleration of carotenoid formation than in the thiamine medium alone.

4) The carotenoid contents of the cell grown under the various kinds of incubation in dark were almost the same as 15 $\mu\text{g/g}$ of dried cell. On the other hand, the carotenoid contents of the cell incubated under light illumination were 80 to 140 $\mu\text{g/g}$ of dried cell. From these results, it was evident that light illumination accelerated remarkably the carotenoid formation in *Rh. minuta*.

5) There was a linear relationship with negative slope between the cell yield and the carotenoid content of the cell when incubation was made under light illumination.

緒 言

Rhodotorula 属酵母の生成する主要なカロチノイドは、3', 4'-didehydro- β , ψ -carotene (torulene) を母核とするカロチノイドであり。高等植物や細菌等、他の生物の生成するカロチノイド組成と著しく異っている¹⁾。またそのカロチノイド生成量は培養液の組成および培養時の物理的な要因によって影響を受けることもよく知られている²⁾。

筆者らは *Rh. minuta* の生成するカロチノイド量が可視光によって調節される現象を認め、この菌種を用いて、可視光とカロチノイド生成との関係を調べ、カロチノイドの生成機構ならびに機能についての知見を求めるべく研究を開始した。本報にこの菌種の生育とカロチノイド生成に及ぼす培養条件について行った実験結果を報告する。

方 法

菌種および培養方法 供試菌株は財団法人醸酵研究所から入手した *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison, IMF 1102である。

基本培養液はグルコース 3g, L-アスパラギン 1水加物 0.13g, KH₂PO₄ 0.1g, MgSO₄ • 7H₂O 0.1g, MnSO₄ • 7H₂O 0.05g, NaCl 0.01g FeCl₃ 1mg, チアミン塩酸塩 10mg, ニコチニ酸アミド 5mg, p-アミノ安息香酸 5mg, パントテン酸ナトリウム 5mg, ピリドキシン塩酸塩 5mg, イノシトール 3mg, ビオチン 1mg を脱イオン水に溶かし100mlとしたもので、その pH は5.1～5.3である。保存培養は基本培養液に、1,5% の粉末寒天を加えて作成した寒天斜面上に植菌し、26°C の恒温器中で行なった。

基本培養液 100ml を 500ml 容坂口フラスコに採り、これに斜面培養の保存菌 3～5 白金耳を接種し、26°C、暗黒下で48時間振盪培養(振幅10cm, 振盪数毎分100)を行って試験培養の種菌を培養した。種菌は遠心分離 (4,000g × 5 分)で集め、殺菌水で良く洗浄した後殺菌水に懸濁させ、26°C、暗黒下で20時間振盪して実験培養に供した。このように調製した種菌のカロチノイド含有量は、およそ 15μg/g である。

実験培養は一定量の種菌 (約15mg) を試験培養液に接種し、前記と同様の条件で振盪培養を行った。なお実験培養時の光照射の光源には蛍光燈 (ナショナル FL20D-SDL) 3本を用い、培養液面の照度を1,000lux とした。

菌体重量の測定 菌体懸濁液の 600nm における吸光度を測定し、予め求めておいた乾燥菌体重量と吸光度との関係から菌体重量を算出した。吸光度の測定には Spectronic 20 分光光度計 (島津) を使用した。

カロチノイドの抽出および定量 実験培養菌体は集菌、洗浄後凍結乾燥する。その一定量を秤取し、80% アセトンに懸濁させ、ガラスピーブを加えて Vibrogn Cell Mill (EDMUND BUHLER 社) にて菌体を破碎し、アセトンで色素を完全に抽出した。このアセトン溶液に多量の水とエーテルを加え、色素をエーテル層に移し、脱水した後エテールを溜去する。残渣を n-ヘキサンに溶かし、n-ヘキサン定容溶液としてカロチノイドの定量に供した。この溶液の吸収スペクトルは 485nm に λ_{max} を示し、構成カロチノイドの主要なものは torulene を母核とするカロチノイドであると推察された。torulene の n-ヘキサン溶液が 484nm に λ_{max} を示し、その吸光係数 $E^{1\%}_{484}$ が 2,680 である³⁾ ことに基いて、抽出した上記カロチノイド溶液の 484nm における吸光度から、全カロチノイド量を torulene 換算値として算出した。吸光度の測定には自記分光光度計 MPS-50L (島津) を利用した。

結果と考察

炭素源の影響 基本培養液のグルコースを種々の糖またはアルコールで置き換えて、菌体の生育とカロチノイド生成に及ぼす炭素源の影響を調べた。炭素源の添加量は培養液の C/N が50になるように加え、光照明下および暗黒下で、96時間培養した。その結果を第1表に示す。

菌体収量については光照射の有無による差はなく、グルコース、マンノース、シュクロースが高収量を示し、ソルビトール、ラクトースおよびメタノールについては資化性が認められない。また、エタノール、ガラクトース、フラクトースは炭素源となりうるが、その資化性は著しく弱い。これらの結果は *Rh. minuta* について LODDER ら⁴⁾が記載している

Table 1 Effect of carbon source on the growth and carotenoid formation in *Rh. minuta*

	cell yield (g dry wt/l)		carotenoid content ($\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell)	
	incubation in light dark		incubation in light dark	
	glucose	mannose	galactose	fructose
glucose	7.20	7.32	92.5	16.3
mannose	7.80	7.24	87.5	16.9
galactose	0.85	0.93	133.5	15.2
fructose	0.92	0.83	132.9	15.6
sorbitol	0.39	0.41	139.5	13.3
sucrose	7.62	7.50	95.0	16.6
maltose	0.36	0.39	144.4	13.6
lactose	0.41	0.47	140.0	17.3
ethanol	1.10	1.01	133.5	15.1
methanol	0.36	0.29	142.5	14.8
none	0.29	0.34	145.7	14.7

Carotenoid content of inoculated cell was 17.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell. Cultures were grown for 4 days.

結果とよく一致している。グルコース、シュクロースが良い炭素源であり、同等の菌体収量を示しているのに対して、フラクトースの資化性が著しく悪いのは、フラクトースの菌体への取り込み機構に何等かの問題があると考えられる。

HAXO⁵⁾ は *Neurospora crassa* について、光は必須ではないが、カロチノイド生成を促進することを見出し、ZALOKER⁶⁾ はこの現象を詳細に調べ、光はカロチノイド生成の trigger であることを報告している。*Rhodotorula* 属酵母のカロチノイド生成への光の影響については、中川⁷⁾らが *Rhodotorula Rh-100* のカロチノイド生成は光によって影響されないと報告している以外に詳細な報告は見当らない。

Rh. minuta のカロチノイド生成は第1表に示したように光によって著しく影響を受ける。即ち、暗所培養菌体は菌体の生育に関係なく、どの炭素源においても接種菌体（暗黒下で48時間培養して得た菌体）のカロチノイド含有量と同程度の含有量を示している。それに対して明所培養菌体のカロチノイド生成量はいずれも暗所培養菌体の5～8倍も多い。しかもそのカロチノイド含有量は炭素源によって大きく異り、菌体の生育に都合のよい炭素源で培養した菌体の含有量はより少く、菌体の生育に悪い条件下では逆に増加を示した。このような傾向は後に述べるすべての実験に共通して認められる。SIMPSON³⁾ らは炭素源として与えた糖の種類によってカロチノイドの量のみならずその組成も変化することを報告しているが、今回の研究ではカロチノイド組成については調べなかった。しかしカロチノイド定量のために測定した吸収スペクトルには大きな差を認められなかった。

窒素源の影響 基本培養液のアスパラギンを種々のアミノ酸で置き換えて、アミノ酸の資化性とカロチノイド生成に及ぼす影響を検討した。それぞれのアミノ酸添加量は培養液のC/Nが50となるようにし、120時間培養した。その結果を第2表に示す。

含硫アミノ酸及びL-ロイシン以外のアミノ酸は全て、*Rh. minuta* の窒素源となりうるが、L-イソロイシン、DL-ノルロイシン、DL-ノルバリン、L-リジン、L-ヒスチジンの資化性は他のものに比べて弱い。L-ロイシンに資化性が認められず、L-イソロイシン、

Table 2 Effect of nitrogen source on the growth and carotenoid formation in *Rh. minuta*

	cell yield (g dry wt/l)		carotenoid content ($\mu\text{g/g}$ dry cell)	
	incubation in light dark		incubation in light dark	
	light	dark	light	dark
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.02	3.34	146.5	18.8
glycine	6.73	6.20	105.7	14.3
L- α -alanine	6.58	6.69	100.0	13.8
L- β -alanine	7.00	6.93	101.5	14.1
L-valine	6.52	6.20	68.8	13.2
L-leucine	0.70	0.71	150.4	15.3
L-isoleucine	2.48	2.94	134.2	15.2
DL-norvaline	5.97	5.81	108.3	13.4
DL-norleucine	4.55	4.20	130.5	12.3
L-aspartic acid	7.93	7.81	96.2	13.3
L-glutamic acid	8.09	8.06	89.2	13.7
L-glutamine	7.60	7.78	95.8	13.8
L-asparagine	7.05	7.31	98.8	16.3
L-lysine	5.80	6.07	112.6	14.7
L-arginine	7.72	7.86	98.8	13.6
L-ornithine	6.49	6.75	112.1	16.9
L-serine	7.20	7.59	97.6	15.4
L-threonine	6.06	5.89	82.4	10.9
L-tyrosine	7.25	7.36	95.5	15.2
L-phenylalanine	6.55	5.99	107.0	16.6
L-tryptophan	6.38	6.02	109.5	17.3
L-proline	7.99	7.89	109.6	15.1
L-histidine	3.35	3.93	75.4	10.9
L-cysteine	0.18	0.15	—	—
L-methionine	0.58	0.38	132.4	19.5
none	0.20	0.22	—	—

Carotenoid content of inoculated cell was 15.3 $\mu\text{g/g}$ dry cell.

Cultures were grown for 5 days.

DL-ノルロイシン, DL-ノルバリン, L-バリンの順に資化性が増加する現象は、その構造とこの菌種のアミノ酸代謝との関係において興味深い。第2表には120時間培養後の菌体量を示したものであるが、窒素源の種類が菌体の増殖速度に大きな影響を与えることを認めた。L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, L-グルタミン, L-アスパラギンは培養開始後60時間で菌体増殖が定常期に達したのが、他のものは96時間後に定常期に達し、資化性の乏しいもの、例えばL-リシンは120時間後においても定常期に達しなかった。なおL-トリプトファン菌体生育への光の影響は何れの窒素源に対しても認められなかった。

カロチノイド生成については、炭素源に関する実験結果と同様の傾向を示した。暗所培養菌体においては窒素源の種類及び菌体の生育状況に関係なく、接種菌体と同等の一定の低い値を示し、明所培養菌体はすべて暗所培養の6~8倍の値を示し、菌体生育の良好な培養基

質に対してはより低く、充分な生育が出来ない場合に高いカロチノイド含有量を示した。しかし L-ヒスチジン、L-スレオニンは明所、暗所共にカロチノイド生成を阻害し、L-プロリンは明所でのカロチノイド生成を促進することが認められた。L-ロイシンはその炭素骨格はイソプレノイドの repeatingunit となる可能性を有しているが、この実験で認められた高いカロチノイド含有量は、上記に基くものではなく、L-メチオニン及び第1表のマルトースに認められるように、生育条件の劣悪な場合に現われる現象であろう。

C:N比の影響 菌体生育およびカロチノイド生成に C/N が如何に関与するかを検討するために、基本培養液（窒素源として L-アスパラギン 1水加物 1.3g/l）のグルコース濃度のみを順次変化して96時間培養を行った。

Table 3 Effect of C:N ratio on the growth and carotenoid formation in *Rh. minuta*

C/N	cell yield (g dry wt/l)		carotenoid content (μg/g dry cell)	
	incubation in light dark		incubation in light dark	
10	1.20	1.35	135.5	16.1
20	3.55	3.15	118.5	17.1
30	5.03	4.80	111.2	14.9
40	6.24	6.75	100.5	15.9
50	7.05	7.30	98.0	13.8
60	7.55	7.55	91.5	16.6
70	8.15	8.30	91.0	15.1

Carotenoid content of inoculated cell was 16.6 μg/g dry cell. Cultures were grown for 4days. Glucose and L-asparagine were used as carbon and nitrogen source.

中川ら⁷は *Rhodotorula Rh-100*の菌体収量とカロチノイド含有量は C/N の増大に伴って共に増加し、C/N が50でほぼ一定に達することを報告している。しかし *Rh. minuta*においては、第3表に示したように、菌体の収量は C/N の増大に伴って増加するが、明所培養菌体のカロチノイド含有量は逆に C/N の増大に伴って減少し、暗所培養菌体のカロチノイド含有量は変化しなかった。

ビタミン類の影響 本実験における基本培養液のビタミン類の組成は RETERSON⁸ の報告に準じたものでチミアン、ニコチン酸アミド、ビオチン、 α -アミノ安息香酸 (PABA)、パントテン酸、ピリドキシンからなっている。しかし中川ら⁷はチアミンのみを使用している。そこで基本培養組成の改良とビタミンのカロチノイド生成に及ぼす影響を調べることを目的として実験を行った。

第4表にその結果を示す。ビタミンが全くない場合 (Exp. 8) 及びチアミンのみを除いた培地 (Exp. 2) では菌体の生育は認められず、菌体生育に対するチアミンの必須性が認められる。しかしチアミンのみで培養した場合 (Exp. 9) 及び PABA のみを除いた場合 (Exp. 5) には他の場合に比べて菌体収量は低く、チアミンと PABA のみを加えた場合 (Exp. 10) に完全な生育が認められ、PABA の生育に対する促進効果が見出される。

カロチノイド生成に対するビタミンの効果としては、Exp. 5, 9, 10 の結果から PABA のみがカロチノイド生成を促進させるものと推察させる。即ち、これまでの実験結果から菌体

Table 4 Effect of vitamins on the growth and carotenoid formation in *Rh. minuta*

	eliminated vitamine	cell yield (g dry wt/l)	carotenoid content ($\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell)
Exp. 1	none	7.95	83.3
2	thiamine	0.50	140.6
3	nicotinamide	8.27	85.5
4	biotin	8.05	91.3
5	PABA	5.15	79.1
6	panthothenic acid	8.30	87.5
7	pyridoxine	7.95	84.4
8	all vitamine	0.18	—
9	other than thiamine	5.00	76.5
10	other than thiamine and PABA	8.08	83.5

PABA : p-aminobenzoic acid.

Carotenoid content of inoculated cell was $16.2 \mu\text{g}/\text{g}$ dry cell.

Cultures were grown under light irradiation for 4 days.

収量が、約5gの時、カロチノイド含有量はおよそ $110 \mu\text{g}/\text{g}$ を示すと考えられる(第1図参照)。しかしPABAの欠除する場合(Exp. 5, 9)のカロチノイド含有量は約 $80 \mu\text{g}/\text{g}$ と低い値を示した。そしてこれにPABAを加えられた場合(Exp. 10)のカロチノイド含有量は、これまでの全実験はおいて得られた菌体収量とカロチノイド含有量との関係(第1図)に合致する。

無機成分の影響 基本培養液の無機成分のうち、 KH_2PO_4 及び MgSO_4 は菌体の生育に必須であるが、 MnSO_4 、 NaCl 、 FeCl_3 の3成分の菌体生育及びカロチノイド生成に及ぼす影響について、ビタミンについて行ったと同様の方法で検討した。*Rh. minuta* は上記3成分を除いても充分な生育が観察されたが、生育初期の増殖速度は3成分が存在する方が良かった。しかし、カロチノイド生成に対してこれらの無機塩は明確な影響を与えたかった。

光の影響 一般に強い光は生物の生育を阻害し、時には死に致らしめることは良く知られている。今回の実験に用いられた光は蛍光燈を光源として $1,000 \text{ lux}$ の照度であり、生物の生育阻止効果は殆ど期待できない。事実、すべての実験において、菌体の生育は光によって影響を受けながら菌体のカロチノイド生成量は光によって著しく影響される。

Rh. minuta は暗黒下で培養した場合、他の生育条件に關係なく約 $15 \mu\text{g}/\text{g}$ のカロチノイド含有量を示したのが、照明下で培養した菌体のカロチノイド含有量は5~8倍も增加了。しかもカロチノイド含有量は暗所培養菌体と異り、培養条件によって著しく変化した。*Rh. minuta* のカロチノイド生成の促進に光が大きな役割を果していることは明らかであるが、その作用機作や光とカロチノイドとの関係等の解明は今後の問題である。

菌体生育とカロチノイド含有量の関係 菌体のカロチノイド含有量は光によってのみ決定されるのではなく、培養条件もその要因の1つとなっている。しかし暗黒条件下におけるカロチノイド含有量は培養条件に關係がないことから、培養条件はカロチノイド生成を直接的に支配するものではなく、2次的なものであると考えられる。

培養条件とカロチノイド含有量との関係は、菌体の生育が良い培養条件において低く、逆

に菌体の生育が困難な条件において高くなることを示している。換言すれば、一定容量の培養液で増殖しうる最大菌体重量が少い場合にカロチノイド含有量が高く、菌体収量の増加に伴って、カロチノイドは減少する。従ってこの菌体収量とカロチノイド含有量の関係を第3表に示した実験結果に基づいて調べ、第1図に示した。その結果はビタミンの項で予測した様に、ほぼ直線的な関係が得られた。

しかもこれまでに得た実験結果の大部分は培養条件に関係なくこの直線関係にあることが認められた。しかし乍ら、L-ヒスチジン、L-スレオニンまたはL-プロリンのように、カロチノイド生成を阻害または促進するような場合にはこの直線関係から著しく逸脱する。ビタミンの項で述べたように、PABAの欠除はカロチノイド生成が抑制されていることも第1図から明らかである。又この結果は、明所培養菌体のカロチノイド含有量が培養基質によって決定されるのではなく、菌体量によって支配されることを意味するとも考えられる。菌体の生育が悪い場合、その培養液の菌体濃度は低い。従って菌体細胞に吸収される光エネルギーの量は多くなり、そのためにカロチノイド含有量が増加したと考えられる、この場合には単位時間当たりのエネルギー量が菌体のカロチノイド生成量を決定することになる。カロチノイドの生合成やその機能を研究する手段として、阻害剤や促進剤がよく使用されるが、*Rh. minuta* に適用する場合、見かけのカロチノイド定量値からその効果を述べることは誤った結果を導くことになる。それを防止するためには第1図の結果が大きな役割を果すと考える。

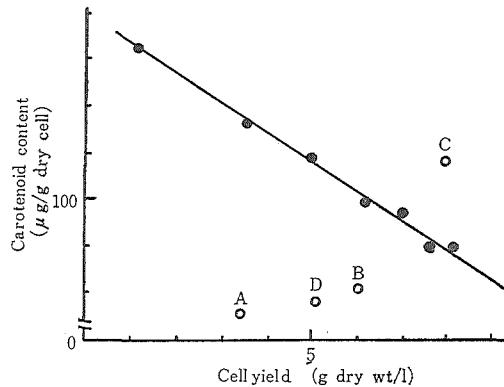


Fig. 1 Relationship between the cell yield and the carotenoid content of the cell. This figure was based on the experiment described in the Table 3. A, B, C and D indicated results of culture in L-histidine, in L-threonine, in L-proline and PABA-deficient medium.

摘要

Rhodotorula minuta の生育およびカロチノイド生成に及ぼす糖類、アミノ酸類ならびにビタミン類の影響について調べた。また光の影響についても併せて検討した。

- 1) 炭素源としはグルコース、マンノース、シュークローズが良く、フラクトース、マルトース、ラクトースは利用されない。
- 2) L-ロイシン、L-イソロイシン、L-システィン、L-メチオニン以外の大部分のアミノ酸は菌体生育の良い窒素源となる。L-ヒスチジン、L-スレオニンを窒素源とした場合、菌体のカロチノイド生成量は抑制された。
- 3) チアミンは *Rh. minuta* の生育に必須である。ビタミンのうちチアミンのみを加えた培養液にL-アミノ安息香酸を加えると、菌体収量及びカロチノイド生成量とともに著しく増大した。
- 4) 黒暗下で培養した菌体のカロチノイド含有量は、その培養条件に関係なく、すべての実験においてほぼ一定の値 (15 μg/g) を示した。一方、光照射下で培養した菌体のカロチノ

イド含有量は 80~140 $\mu\text{g/g}$ を示し、光はあきらかにカロチノイド生成を著しく促進した。

5) 光照明下で培養した場合、菌体の収量とその菌体のカロチノイド含有量との間には負の勾配を持つ直線関係が成立した。

文 献

- 1) SIMPSON, K. L. : The Chemistry of Plant Pigment (C. O. CHICHESTER eds.), 9—24 Academic Press, New York and London (1972)
- 2) GOODWIN, T. W. : Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment (GOODWIN, T. W. eds.) 147—184, Academic Press, London and New York (1965)
- 3) SIMPSON, K. L., T. O. M. NAKAYAMA, C. O. CHICHESTER : Biochem. J., **92**, 508—511 (1962)
- 4) KREGER, N. J. W. : The Yeasts (J. LODDER et al eds.) (2nd Ed.), 645—667, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1967)
- 5) HAXO, F. : Arch. Biochem. Biophys., **20**, 400—407 (1946)
- 6) ZALOKER, M. : ibid, **50**, 71—76 (1954)
- 7) 中川昌平・辰巳忠次 : 農化 **34** (3), 195—198 (1965)
- 8) PETERSON, W. G., W. R. EVANS, EILEEN LECCE, T. A. BELL, J. L. ETCHELLS : J. Bacteriol., **75**, 586—591 (1958)

正 誤 表 (Errata)

頁 (Page)	行 (Line)	誤 (Erratum)	正 (Correct)
43	34	免疫学的意義についても	免疫学的意義について ⁹⁾ も
50	6	SITTMANN <i>et al.</i> ¹³⁾ .	SITTMANN <i>et al.</i> ¹³⁾
50	6	KULENKAM <i>et al.</i> ⁸⁾ .	KULENKAMP <i>et al.</i> ⁸⁾
52	Table. 2 5	0.0248±0.0030b	0.0248±0.0030 ^a
62	19	YAMAMOTO は ⁶⁾	YAMAMOTO は ⁶⁾
88	2	IMF	IFO
90	10	68.8	98.8