γ線照射による *Rhodotorula* 属菌種の 油脂生成におよぼす影響

大阪府大農学部 辰巳忠次, 中川昌平
渡辺淳治, 西川久子

Effect of γ-Radiation on the Fat Production of
Rhodotorula sp.

Chuji TATSUMI, Masahira NAKAGAWA, Junji WATANABE
and Hisako NISHIKAWA

Department of Agricultural Chemistry, College of
Agriculture, University of Osaka Prefecture

Summary

The cell of a strain of *Rhodotorula* sp. (Rh-110) isolated by the authors, contains 10-45 per cent of crude fat and 45-20 per cent of protein. In general, both fatty acid and ergosterol content of the metabolites of the Rh-110 strain is quite constant, being independent from the culture conditions employed. Therefore, it is expected that particular mutant which is to be obtained in irradiation might give specifically varied contents of fatty acids and ergosterol.

The present paper reports general characteristics of such mutant strains obtained.

1. 緒 言

筆者らが分離した *Rhodotorula* に属する菌株 Rh-110 は廃糖蜜その他含糖廃液によく生育し、油脂生成能が大で、培地の C/N 比を適当に変えることにより油脂含量を 10~45% にすることができ、これに対応して蛋白質含量が 45~20% になることはすでに報告した。Ph-110 株の油脂は、ある一定条件下で培養した場合はほぼ一定の脂肪酸組成と不飽和物含量を示すものであるから、菌株に変異を起させることにより、ある特定の脂肪酸または不飽和物の生成能を変えることができると予想される。一方脂肪酸の生合成についてはすでに多くの研究があるが、酵母に関しては、パン酵母、蛋白酵母など油脂含量の少ない菌種で行なわれているので、Rh-110 株のように油脂生成能の大なる酵母においても同様であるか否かを知る必要がある。そこで Rh-110 株に γ線を照射することによって変異菌株の油脂含量が低いものから高いものに至る各種のものを作成し、これらの変異菌株を用い脂肪酸生合成について比較検討を行なっている。今回はこの研究の一環として Rh-110 株に γ線を照射することにより変異菌株を作成し、それらの一般的性質について報告する。

2. 材料および方法

本実験に用いた菌株は研究室保存の *Rhodotorula* 属の Rh-110 株である。

照射試料の調整： 保存培地上の酵母1白金耳を採り, yeast extract 0.5%, glucose 1% の液体培地 (pH 5.5) 50ml の入った振盪フラスコ中に接種し, 30℃, 24時間振盪培養を行なった。この一部を適当に希釈し, 血球計算盤上で総菌数を測定した。この菌数測定の結果に基いて, もとの細胞懸濁液を 10^7 cells / ml の細胞濃度になるように磷酸緩衝液で希釈し, 照射試料とした。

照射： 上記調整による細胞懸濁液 2.5 ml を 5ml 殺菌したガラスアンプルに入れ照射を行なった。照射は大阪府立放射線中央研究所にて Co^{60} を用い $5 \times 10^3 \sim 8 \times 10^4 R$ の線量で行なった。

照射後の処理： 照射を終った懸濁液は殺菌水で適当に希釈した後, 55℃にて溶かした寒天培地中に懸濁し, 平板培養を行なった。寒天培地は蒸留水 1000 ml 中に asparagine 0.2g, $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g, NaCl 0.05g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05g, glucose 40g, $FeCl_3$ 200μg, $ZnSO_4$ 200μg, vitamin B₁ 30μg, yeast extract 0.03g, agar 2g を含有し, pH 5.5 に調整されたものである。

変異菌株の採取はコロニーの形態および色調を対調とした。採取した菌株は寒天培地にて斜面培養を行ない保存した。

菌体収量の測定： 保存培地上の採取菌1白金耳を採り前記寒天培地より寒天のみを除去した培地 50ml 入り振盪フラスコ中に植菌し, 30℃にて 48, 72, 96時間振盪培養を行なった。培地を遠沈して菌体を集め, 乾燥して菌体重量を測定し, 最大量のものを最大菌体収量とした。

油脂含量の測定： 前記最大菌体収量の乾燥菌体に約 7.5 g の石英砂を加え, 乳鉢にてよくすりつぶし, ソックスレー抽出器にて 50℃で 8時間エーテル抽出を行ない, 抽出物を測定した。

油脂の脂肪酸組成の測定： 油脂 200~300 mg を採り, これに 6 g の苛性加里をできるだけ少量の水に溶解した上, 1.0 ml のアルコールに希釈した溶液を加え, 鹼化を行なった。次に多量の水を加え, これに稀硫酸を加えて酸性にすると, 脂肪酸が上層に分離するので, これをエーテルで抽出し, 抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し, エーテルを除き又脂肪酸を分離した。この脂肪酸を Gehrke & Goerlitz の方法によってメチル化して脂肪酸のメチルエステルを造る。

脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成を測定した。柳本製 GCG-550F を使用し, 条件は次のごとくである。Column Polyester DS w/w 10% celite 545, 80~100 mesh, 0.75 m φ 3mm; Carrier gas N_2 , Flowrate 35 ml/min; Column temp. 150℃; Sensibility $10^{81}/1$ 。

カロチンの測定： 油脂測定における同様の菌体を n-hexan にて抽出し, 抽出されたカロチンをスペクトロフォトメーターを用い, 可視部にて吸光度を測定した。

エルゴステロールの測定： 油脂測定における同様の菌体をエーテルにて 10時間抽出し, この抽出物をクロロホルムで溶解し, 一定量を採り, リーベルマン試薬を加え, スペクトロフォトメーターで 660 mμ の波長の部分を測定した。

3. 実験結果および考察

照射線量に対する変異菌株採取率を Table 1 に示した。

Table I. Effect on the main characteristics of *Rhodotorula* sp. by irradiation

Dose	Rate of appearance of variation
5×10^3 R	0 %
1×10^4	1.9
2×10^4	38.5
4×10^4	50.0
8×10^4	9.6

2×10^4 R と 4×10^4 R との照射線量の場合を合すると約 90 % の高い変異菌株採取率を示している。なお変異菌株とは採取菌株の中 Rh-110 株となんらかの性質が異なる菌株を意味する。

変異菌株の諸性質を Table 2 に示した。比較のため Rh-110 株についても記した。また Rh-110 株の 1 日培養より 5 日培養までの範囲では脂肪酸組成にはほとんど変化が認められなかったもので、同じ培養条件での脂肪酸組成は生育の老若にあまり関係がないと推定される。Table 2 は油脂含量の高いものから順次並べて、諸性質を示してある。エルゴステロールおよびカロチンは例外があるが、大体油脂含量が減少するにしたがって少なくなっており、一般に油脂含量と関係があると推定される。またカロチン量の多いものは吸収極大が長波長にあることは注目すべきことである。

脂肪酸組成については、変異菌株は全般にリノール酸含量が多くなっており、特に № 40, 50, 80 株は非常に多いので不飽和脂肪酸の生合成の研究に使用できるものと推察される。

№ 79 株のごとく形態的な変異菌株も分離された。この菌株は疑菌糸を有し、脂肪酸組成が Rh-110 株に比べて非常に異なっている。また初期の目的である油脂含量の極端に少ない № 50 株も分離された。この № 50 株と Ph-110 株を用いて比較実験を行なうことにより、Rh-110 株の油脂生成機構を研究すれば興味あることと思考される。

Table II. Characteristics of variable strains of *Rhodotorula* sp.

No. of strain	Incuba- tion time (day)	Dose R	Strain used irradia- tion	Maximum yield of cells mg/100ml	Content of fat %	Content of fatty acids				Max. ab- sorption of carotene mp	O. D. of carotene g/50ml	Content of ergo- sterol %	Color of colony
						Palmitic %	Stearic %	Oleic %	Linoleic %	Linolenic %			
64	4	4 10 ⁴	Rh-110	1366.6	54.6	21.7	14.4	45.1	15.0	3.8	0.8872	1.29	Chinese red
1	3	2 10 ⁴	Rh-110	1163.0	47.4	22.3	5.9	51.4	20.4	trace	0.905	1.40	pink
3	2	1 10 ⁴	Rh-110	1388.4	43.9	27.9	11.5	47.2	10.8	2.8	0.8521	1.04	Chinese red
62	4	4 10 ⁴	Rh-110	1212.6	42.8						0.739	1.60	Chinese red
9	2	5 10 ³	Rh-110	1366.8	41.0	29.5	13.0	37.6	15.9	3.1	0.6079	1.22	Chinese red
20	2	4 10 ⁴	Rh-110	1286.6	35.6	26.3	11.3	32.2	25.3	trace	0.768	1.12	Chinese red
19	4	4 10 ⁴	Rh-110	847.0	34.2	29.6	10.5	27.6	22.4	10.0	1.64	0.77	Red
55	4	4 10 ⁴	1	1182.0	32.0	30.8	7.7	34.4	21.9	5.2	0.396	0.90	Light yellowish brown
53	3	4 10 ⁴	Rh-110	1323.4	32.0	24.2	3.0	52.2	16.1	trace	0.577	1.13	Chinese red
43	4	4 10 ⁴	Rh-110	1201.4	29.8	31.3	10.4	35.4	17.3	5.6	0.316	1.27	Chinese red
27	4	2 10 ⁴	1	1223.8	29.2	27.3	14.2	42.7	23.9	3.4	1.054	0.87	Yellowish brown
40	4	4 10 ⁴	Rh-110	893.8	22.1	26.3	12.1	29.5	25.6	6.6	0.135	0.97	Yellowish brown
79	4	2 10 ⁴	21	1142.0	18.4	49.9	4.1	23.1	22.2	trace	0.030	0.44	Yellowish brown
19	4	4 10 ⁴	Rh-110	928.8	17.6	21.7	2.5	49.3	26.0	trace	0.069	0.39	White
81	4	4 10 ⁴	21	1303.2	12.3	29.0	12.2	39.6	19.3	trace	0.020	0.25	White
21	4	4 10 ⁴	Rh-110	1410.2	9.5	25.6	7.6	48.0	18.8	trace	0.087	0.33	White
80	4	2 10 ⁴	21	1352.6	10.0	24.8	4.0	44.7	26.6	trace	0.082	0.32	White
50	4	4 10 ⁴	Rh-110	1025.0	2.1	24.0	6.4	33.4	43.3	3.1	0.002	0.26	White
Rh-110	2			1363.2	37.1	27.2	9.5	48.6	11.6	3.3	0.741	0.69	
Rh-110	3					30.2	9.2	46.1	11.6	2.8			
Rh-110	4					27.1	9.0	47.3	13.5	3.0			