Rhodotorula 属菌種のカロチン生成に就いて (第1報)**Rhodotorula* 属 *Rh-100* 株のカロチン生成を規制する一般的条件

中川 昌平, 辰己 忠次 (大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和34年9月5日受理

緑葉のカロチノイドは水溶性の protein complexes として時には lipid droplets として葉緑体内に葉緑素と密接な関係をもって存在している。高等植物では光合成に関与するためカロチン生合成の研究に限度があり、かつ明確さを欠くので近年微生物のある種のものがカロチノイドを生合成することから、これらの微生物を使用してカロチン生合成の研究が行われるようになってきた。筆者も *Rhodotorula* 属菌種を使用してカロチン生成機構の研究を行わんとしたが生成されるカロチノイドの種類ができるだけ少いことが望ましいので、菌種の分離選択を行い、殆ど β -カロチンのみを生合成する菌種 *Rh-100* をえた。この菌種は油脂生成能も大きい。本報にこの菌種のカロチン生成に関する培養条件の実験結果を報告する。

実験および結果

1. 実験方法 基本培養液は KH_2PO_4 0.1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaCl 0.05 g, FeCl_3 0.1 mg, アスパラギン 0.2 g, グルコース 3 g, チアミン 0.05 mg を蒸留水に溶解して 100 cc としたもので pH 5.2 である。基本培養液 100 cc を 500 cc 容振盪フラスコに採り、これに斜面培養の保存菌 1~2 白金耳を接種し、28° で3日間振盪培養(振幅 7 cm, 振盪数毎分 140)を行って試験培養の種菌を作成する。一定量の種菌(乾燥菌体として 25~30 mg になるよう予め測定しておく)を試験培養液に接種し、前記と同様の条件で特に記載しない限りは4日間振盪培養を行う。菌体は遠心分離によって採り、水洗したのち素焼板に塗布してできるだけ水分を除いてから 50° で減圧乾燥する。この乾燥菌体の一部は油脂の定量に、残部はカロチノイドの定量に用いる。油脂の定量は一般法に従い、先ず乳鉢に一定量の菌体と海砂を採りよく粉碎し、ソックスレー抽出器によりエーテルで10時間抽出し、抽出物を 105° で2~3時間乾燥して秤量するのである。カロチノイドの定量は油脂定量と同様に一定量の粉碎菌体を作り、これをガラスフィルターに採り、エチルアルコールで4回抽出する。次にベンゼンで5回抽出する。両抽出液を併合して水素気流中で減圧濃縮し、濃縮物に等量の5%カセイカリアルコール溶液を加え水素を充し一昼夜室温に放置して鹼化を行う。鹼化後水洗し不鹼化部分をベンゼンに移し更にアルカリを除く。ベンゼン部分は水素気流中で減圧濃縮し乾固する。これを石油エーテル (b. p. 40~60°) に溶解させてカロチノイドのカラムクロマトグラフィーに用いる。カラムは次のように調製する。径 1 cm, 高さ 20 cm のガラス管の下部にコックを付したカラムに石油エーテルを充し、これにメルク製活性アルミナを徐々に加えて高さ約 10 cm になるまで充填する。このカラムにカロチノイドの石油エーテル溶液を定量的に加え上層部に完全に吸着させる。先ず石油エーテルに 1% のアセトンを加えた展開剤で溶出を行い溶出物 Fraction I をえる。次に 3% アセトン石油エーテルで溶出を行い溶出物 Fraction II をえる。Fraction I, II をそれぞれ水素気流中で減圧濃縮、乾固し、再び石油エーテルに溶解せしめ一定量とする。3% アセトン石油エーテルで溶出後もなお少し赤色帯がカラムの上層部に残る。これを 6%, 12% アセトン石油エーテルで溶出を行い Fraction I, II と同様処理し、そのカロチノイドの定性、定量を行ったが、これらに関しては次報で述べる。Fraction I は α -カロチンであり、Fraction II は β -カロチンである。*Rh-100* に就いては α -カロチンは全カロチンの約 10% で、6%, 12% アセトン石油エーテル溶出のカロチンは 5% 以下である。Fraction I, II はベックマン型の photoelectric spectrophotometer を使用して 444, 448 m μ で測定する。なお *Rh-100* の β -カロチンはメルク製 β -カロチンの吸収スペクトルおよび混合クロマトグラフィーによって β -カロチンであることを確認した。なおこの実験に於ては主たるカロチンが β -カロチンであるから、 α -カロチンと共に 448 m μ で測定してカロチン含量を求めた。

* Studies on the Carotenogenesis of *Rhodotorula* sp. Part I. General Conditions Governing Carotene Synthesis by *Rhodotorula* sp. *Rh-100* strain.

By Masahira NAKAGAWA and Chuji TATSUMI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Osaka Prefecture)

第 1 表 炭素源としての糖類の資化性

糖 類	菌体収量 g/100 cc	油脂含量 g/100 g	カロチン含量 μg/g
グルコース	0.904	35.75	35.0
マルトース	0.941	34.75	37.8
フラクトース	0.913	35.12	36.0
キシロース	1.082	25.44	27.8
シュクロース	0.879	20.50	38.2
グリセリン	1.128	26.78	17.7

4 日間培養

第 2 表 窒素化合物の資化性

窒 素 化 合 物 (N=0.0374%)	菌体収 量 g/100 cc	油脂含 量 g/100 g	カロチ ン含量 μg/g
硫酸アンモニウム	0.375	14.40	1.9
アスパラギン	1.026	37.63	52.1
グリシン	1.065	44.90	34.6
L-ロイシン	0.813	32.80	57.3
D,L-バリン	0.896	32.50	59.3
酢酸アンモニウム	0.762	35.00	46.6
グルタミン酸ソーダ	0.959	41.20	48.4
L-ロイシン+アスパラギン	0.959	41.00	48.0
D,L-バリン+アスパラギン	1.015	26.00	53.4
L-ロイシン+D,L-バリン	0.880	30.40	56.4

4 日間培養

ウムは非常に悪かった。菌体収量、油脂含量、カロチン含量を通じてアスパラギンが最も良かった。理論的にその炭素骨格がカロチノイドの repeating unit となる可能性のあるバリン、ロイシンが他の窒素源と比較してカロチン生成に於てあまり差異を示さなかったことは Garton 等⁽¹⁾の報告と相通ずる。

4. 培養液の C:N ratio に就いて カロチンおよび油脂生成上 C:N ratio が如何に関与するかを検討するため基本培養液のグルコース濃度を順次変化して培養を行った。その結果を第 3 表に示す。菌体収量、油脂含量、カロチン含量は C/N の増大すると共に増加するが、C/N の 40~50 に於て一定となる。即ちアスパラギン 0.2%, グルコース 4~4.5% が最適条件と考えられる。

5. 培養時間とカロチンおよび油脂生成量の関係 一般に微生物の色素生成は 3 つの phase に分けられる。*Rhodotorula rubra* では (1) 最高カロチン濃度に達する迄の活発な合成時期, (2) 一定濃度で継続する時期,

(3) 色素が次第に消失して行く時期である⁽²⁾。Garton 等⁽¹⁾も *Phycomyces blakesleeana* で同様な経過をえているが、生育、油脂生成が最高になって後色素生成が急速に増加すると報告している。筆者は *Rh-100* の振盪培養によって上記研究者の示す色素生成時期を明確に区別しえなかったが、ある傾向を示す結果をえたので第 4 表に掲げる。ここに炭素源として特にグリセリンを用いたのは第 1 表に示した如く生育は充分であるが油脂、カロチンの生成が少いことからカロチン生成に及ぼす他の影響を検索するのに好都合であると考え、グルコース炭素源と対照したのである。グリセリンでは菌体収量に就いては培養 3 日で非常に少く 4 日で急激に増加し 5 日で減少し始める。カロチン含量に就いては 3 日で最高で以後減少する。このような経過は上記研究者の示す経過と一致しないようである。然しグルコースでは生育、カロチン含量共に Garton 等⁽¹⁾の報告に略一致している。

2. カロチン生成に及ぼす炭素源の影響 基本培

養液のグルコースを種々の糖類で置き換えてカロチン生成に及ぼす炭素源としての糖類の影響を検討した。

その結果を第 1 表に示す。菌体収量ではグリセリン、キシロースが良くその他はこれに次ぎ、油脂含量ではグルコース、マルトース、フラクトースが特に良くグリセリン、キシロースはこれに次ぎシュクロースはやや劣

った。カロチン含量ではシュクロース、マルトース、フラクトース、グルコースが特に良くキシロースやや良ぐグリセリンは良くなかった。即ち菌体収量より換算したカロチン生成量はグリセリンが最も良くなかった。

3. カロチン生成に及ぼす窒素源の影響 基本培

養液のアスパラギンを種々の窒素化合物で置き換えてカロチン生成に及ぼす窒素源の影響を検討した。その結果を第 2 表に示す。菌体収量ではアスパラギン、グリシン、D,L-バリン+アスパラギンが良く硫酸アンモニウムは良くなくて、カロチン含量では D,L-バリン、L-ロイシン、D,L-バリン+アスパラギン、L-ロイシン+D,L-バリン、アスパラギンが特に良く硫酸アンモニ

第 3 表 C:N ratio とカロチン生成量

C/N	菌体収量 g/100 cc	油脂含量 g/100 g	カロチン含量 μg/g
8	0.355	5.80	15.60
16	0.592	11.79	19.40
24	0.698	20.40	23.30
30	0.858	26.99	31.90
42.8	1.016	33.06	50.50
50	1.103	41.27	54.10

4 日間培養

第 4 表 グルコースおよびグリセリン培養液に於ける培養日数と油脂、カロチン生成量

培養 日数	炭 素 源		菌体 収量 g/100 cc	油脂 含量 g/100 g	カロチ ン含量 μg/g
	グルコース g/100 cc	グリセリン g/100 cc			
3	4	—	1.108	33.84	42.80
	—	4	0.713	21.57	28.30
4	4	—	1.036	36.66	56.40
	—	4	1.243	30.36	22.00
5	4	—	0.926	43.70	71.50
	—	4	0.749	34.50	7.10
6	4	—	0.612	43.50	—
	—	4	0.579	41.54	—

6. グリセリン培養液に於けるカロチン生成に及ぼすグルコースの影響 C/N に関して炭素源の増大と共にカロチン含量が増加するという事実に基づいて, *Mucor hiemalis*, *Phycomyces blakesleeanus* のカロチン生成に就いての Schophers の先覚的な研究で C/N がカロチン生成量を決定する重要な因子であると述べている⁽³⁾. 又 Goodwin 等は生育, 油脂生成が最高になった後残存するグルコースが *Phycomyces* に於けるカロチン生成の大部分をなすと考えた⁽⁴⁾. 同様な考え方は, 細菌を用いた Kleinzeller の報告で油脂生成の説明に提言されている⁽⁵⁾. 筆者はグルコース培養液ではこれらの研究者と同様な考え方をとるべき実験結果をえているが, グリセリン培養液ではこの考え方が適用されえない結果をえた. そこで筆者はこの考え方を再検討せんとして第 4 表の結果を基としてカロチンの大部分が過剰のグルコースから生成されるか否かを確認するためカロチン, 油脂の生成

第 5 表 グリセリン培養液に於けるグルコース添加時期による油脂, カロチン生成量の変化

グルコース 添加時期 (培養開始後の時間)	菌体収量 g/100 cc	油脂含量 g/100 g	カロチン 含量 μg/g
0	1.173	51.40	35.60
24	1.195	51.90	25.80
48	1.231	48.70	20.60
72	1.351	57.30	17.20
無添加 4日間培養	1.058	26.00	14.40

第 6 表 グリセリン培養液に初期からグルコースを添加した場合の培養時間と油脂, カロチン生成量

培養 時間	菌体収量 g/100 cc	油脂含量 g/100 g	カロチン 含量 μg/g	グルコース g/100 cc
24	0.588	19.83	6.60	0.06
48	0.878	38.44	22.20	0
72	1.108	43.20	28.40	0
96	1.173	51.40	35.60	0

量の少いグリセリン (3%) 培養液を用い第 5 表に掲げるような各培養時期にグルコース (濃度 1% になるように) を添加してその影響を検討した. 第 5 表の如くである. またグルコースを最初から添加して経時的にその影響を検討した結果を第 6 表に示す. グルコースの添加時期は生育, 油脂生成に就いては後期の方が良いが, カロチン生成に就いては初期の方が良く遅くなると共に悪くなった. また第 6 表によれば初期に添加したグルコースは 24~30 時間で消失している. 即ちグルコースはグリセリンよりも選択的に利用されるにもかかわらずカロチン生成量は最も多かった.

7. カロチン生成に及ぼす光の影響 Derenter⁽⁶⁾ は *Neurospora sitophilla* に就いてカロチン生成に光の必要を見出し, Haxo⁽⁷⁾ は *Neurospora crassa* に就いて必須ではないが 520~580 mμ の光が特に効果があり phytofluene の生成には効果がなかったと報告している. 筆者は *Rh-100* に就いて光の影響を殆ど認めなかった.

考 察

炭素源のカロチン生成に及ぼす影響は菌種によって異り, *Rhodotorula sarniei* ではグリセリンが良く⁽⁸⁾, *Phycomyces blakesleeanus* ではマルトース, グルコースが最も良く次でキシロース, フラクトースが良くラクトース, グリセリンには生育しないと言われている⁽¹⁾. 筆者の *Rh-100* ではシュクロース, マルトース, フラクトース, グルコースが略同程度に良くキシロース, グリセリンはあまり良くなかった. また実験結果のところで記述しなかったが, 筆者はグリセリン (3%) + グルコース (1%) 培養液に於けるグルコースを有機酸で置き換えた場合をも検討した. その結果酢酸は生育を殆ど完全に阻害し, カロチンを生成しなかったがビルビン酸, クエン酸, α-ケトグルタル酸, コハク酸, リンゴ酸 (K または Na 塩) はグルコースの場合に比して約 1/2 のカロチンの生成を見た.

これに対し *Phycomyces* は酢酸をよく同化してカロチンを生成したと報告されている⁽⁹⁾. このように有機酸が炭素源となった場合にも菌種により相当差異あることを認めた.

窒素源のカロチン生成に及ぼす影響に就いては特にバリン, ロイシンの炭素骨格が理論的にカロチノイドの repeating unit となる可能性のあることから Garton 等⁽¹¹⁾ はこの可能性を研究すると共に他の窒素源の影響に就いても実験を行ったが, 何れの場合もグリシンに比してあまり促進作用を認めなかった. 然し Goodwin 等⁽¹⁰⁾ は培養液のグルコース濃度を 1% にしてこれらの窒素源の影響を検討したところ, ロイシン, バリンの脱アミノ化合物がカロチノイドの生成を促進することを認めた. また同氏等⁽¹¹⁾ は β-methylcrotonate およびその類似化合物を用いて実験を行った結果 β-methylcrotonate が促進的に作用することを見出した. 筆者の *Rh-100* ではこれらの窒素源は第 2 表に示した如くアスパラギンとあまり大差なく, かつカロチン生成の少いグリセリン培養液を用いた場合でも同様であった. 即ち Garton 等⁽¹¹⁾ の報告と相通ずる.

培養時間とカロチン生成の関係に就いては筆者の *Rh-100* の実験によりグルコース炭素源の場合カロチン生成

は略 3 つの phase に分けることができ、他の菌種で行わた実験結果^{(1),(2)}と一致するが、グリセリン炭素源の場合は一致しない。即ち生育が最高に達するまでにカロチン生成が最高となり、生育が最高に達した時はすでにカロチンが減少し始めている。このことから炭素源が変わることによって必ずしも一般的 pattern に当てはまるものでないことが理解される。微生物が蓄積する油脂の生理的意義は一般に不良栄養条件下に於てエネルギー源として消費されることから貯蔵物質であると考えられている。即ち *Rhodotorula gracilis*⁽¹⁴⁾ の生成する油脂はエネルギー源として利用されることが報告されているが、*Rh-100* による油脂の生成を観察すると第 4 表に示した如くグルコース、グリセリン何れの炭素源の培養液に於ても油脂の減少量より菌体の減少量の方が割合が大きく、前記の報告と相反する結果がえられ、蓄積油脂は老廃生成物的な挙動をすることが見出された。然しこの結果も培養液の窒素源をアスパラギンから酵母抽出液に変更した場合あるいは廃糖蜜培養液の場合には逆になった。即ち培養液の組成により蓄積油脂は貯蔵物質的にもなり、老廃物質的にもなることが考えられる。このことから油脂の生成、分解の酵素系が菌種によって何処かの段階で少し異っているのではないかと推察される。本来は、油脂は貯蔵物質として炭素源が豊富に存在する場合に多量に蓄積されるのであろうと考えられている。

C:N ratio に関しては Schopfer⁽⁴⁾ は *Mucor hiemalis* と *Phycomyces blakesleeanus* のカロチン生成に於て C/N はカロチン生成を制御する重要な因子で、高い ratio ではより多くのカロチンを生成することを報告し、Garton 等⁽¹⁾ は、*Phycomyces* の窒素代謝とカロチン生成の関連性の研究に於て良く生育した菌体を、グルコースを含み同化しうる窒素源を含まない培養液に移植した時、カロチンが生成されないと報告したが、その後 Goodwin⁽⁵⁾ 等は窒素源のない培養液でカロチンの生成が減少するのは培養液の pH が相当影響するためであって、緩衝作用を持たない場合は窒素源を含んだ培養液よりも炭素源のみの培養液の方がカロチンをより多く生成しうることから、菌によるカロチン生成の大部分は生育、油脂生成が終った後なお培養液に残在している炭素源から生成されるのであると結論した。筆者の *Rh-100* による C/N の実験に於て C/N の増加と共にカロチン生成が増大したが、炭素源としてグルコース、グリセリンを併用する場合グリセリンを基本炭素源としてグルコースの添加時期の変更によるカロチン、油脂の生成に及ぼす影響を検討した結果第 5, 6 表に示した如く、炭素源、窒素源の絶対量は同一であるにもかかわらずグルコースの添加時期が油脂生成に就いては培養の後期、カロチン生成に就いては培養の初期である場合それぞれ良好であることを知った。然も培養初期に添加されたグルコースは約 30 時間で消費されていることから大部分のカロチン生成が生育後に残存している炭素源に基づくという Goodwin の提言と相反し、この問題の解明は今後に残されている

要 約

Rhodotorula 属菌種によるカロチン生成機構研究のため菌種の選択を行い、殆ど β -カロチンのみを生成する *Rh-100* をえた。この菌種は油脂生成能も大きい。炭素源、窒素源の影響を検討しカロチン生成にはグルコースが良くグリセリンが悪くアスパラギンが良かった。C/N は 40~50 が適当であった。培養時間とカロチン生成量の関係はグルコース培養液では生育と共に増加したがグリセリン培養液では一致しなかった。グリセリン培養液に最初からグルコースを添加した時はグルコースが先ず消費され、これがカロチン生成を促進した。然しグルコース添加時期が遅くなるとカロチン生成には殆ど影響なく、油脂の生成を促進した。光の影響は殆どなかった。

本報告の要旨は 1956 年の日本農芸化学会大会に於て講演した。

(1) G. A. Garton, T. W. Goodwin, W. Lijinsky: <i>Biochem. J.</i> , 48, 154 (1951).	(7) F. Haxo: <i>Arch. Biochem.</i> , 20, 440 (1949).
(2) T. W. Goodwin: The Comparative Biochemistry of the Carotenoids, p. 109 (1952).	(8) C. Fromageot, J. L. Tschang: <i>Arch. Mikrobiol.</i> , 9, 424 (1938).
(3) W. H. Schopfer: Plants and Vitamins. Waltham, Chronica Botanica. (1943).	(9) W. H. Schopfer, E. C. Grob: <i>Experientia</i> , 6, 419 (1950).
(4) T. W. Goodwin, J. S. Willmer: <i>Biochem. J.</i> , 51, 213 (1953).	(10) T. W. Goodwin, W. Lijinsky, J. S. Willmer: <i>Biochem. J.</i> , 50, 268 (1952).
(5) A. Kleinzeller: <i>Advances in Enzymol.</i> , 8, 299 (1948).	(11) T. W. Goodwin, W. Lijinsky, J. S. Willmer: <i>Biochem. J.</i> , 53, 208 (1953).
(6) T. W. Goodwin: The Comparative Bio-	