酵母 *Lipomyces starkeyi* の生育と脂質生産のための 最少培地の決定*

是永 博**, 長沼孝文, 兎束保之, 田中健太郎
(山梨大学工学部醸酵生産学科, **第一製薬株式会社研究所)

昭和 52 年 1 月 24 日 受 理

Determination of Simple Defined Media for Normal Growth and Lipid Production of the Yeast *Lipomyces starkeyi* (Studies on Simple Defined Media for Normal Growth and Lipid Production of the Yeast *Lipomyces starkeyi* Part II)

By Hiroshi KORENAGA, Takafumi NAGANUMA,
Yasuyuki UZUKA and Kentaro TANAKA

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering,
Yamanashi University, Kofu

A simple defined medium (named SW-C medium) was proposed previously for a minimal defined medium of *Lipomyces starkeyi* IAM 4753. The medium consists of glucose, biotin, and the minimum amounts of inorganic salts which were expected to be consumed completely during the entire growth of the cells. But the medium failed to support normal growth of the yeast in the retardation and the stationary phases of growth.

This paper deals with the improvement of the medium to two kinds of defined media by slight modification of the medium composition. The one (named MC medium) was defined to be a simple medium supporting normal growth progress throughout growth period, and the other (named ML medium) was defined to be a medium having a composition suitable for the production of lipids in the yeast cells.

In the first step of the study, modification of the SW-C medium to MC medium was achieved by increasing in NH_4^+ concentration in the SW-C medium. However, the lipid content of the cells grown in MC medium was very low even at the stationary phase of growth.

In the second step of the study, decrease in the concentration of Zn^{2+} in MC medium was observed to be favorable to increase the lipid content of the yeast in the stationary phase of growth although the level of cell density (total cell number/ml) in the medium decreased. Decrease in concentration of other minor elements, such as Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , also caused decrease in cell density in the stationary phase of growth, but failed in the appreciable increase in lipid content of the cells. A little increase in lipid content of the cells was observed with the increase in Mg^{2+} concentration in the medium. From these results, the composition of ML medium was determined. (Received January 24, 1977)

緒 論

酵母 *Lipomyces starkeyi* は生育にともなって菌体内

* 酵母 *Lipomyces starkeyi* の最少培地に関する研究
(第 2 報).

に多量の中性脂質を脂肪球として蓄積する性質があり、
そのために発見以来長らく脂質生産に適した酵母として
注目を集めてきた⁽¹⁻³⁾。しかし現在までに本菌を用いて
脂質生産を行うことを目的として、その正常な生育にと
って必要な最少限の成分だけからなり、しかも脂質生産

に適している合成培地の組成を決定しようとする試みは行われていない。前報⁽⁴⁾において、われわれは供試菌株 *Lipomyces starkeyi* IAM 4753 が正常に生育するときに見かけ上消費する培地成分の種類を決定するとともに、それらの最大消費量をも明らかにした。この最大消費量に基づいて新たな合成培地 (SW-C 培地) を作製し、その培地中に本菌を培養したが定常期の全菌数は低い値を示し、脂肪球も十分に肥大しなかった。

そこで本報では、本菌を培養したときに、その増殖の経過と定常期の全菌数が正常な域値に入り、しかもその組成が添加成分の種類からみても、またその添加量からみても最少限になった培地 (MC 培地) の検索を第 1 の目的とした。さらにこの MC 培地に改良をほどこして生育はそのまま正常な域値内にあって、かつその菌体内脂肪球が著しく発達、肥大する培地 (ML 培地) を見出すことを第 2 の目的とした。

実験方法

1. 培養および培地組成 供試菌株 *Lipomyces starkeyi* IAM 4753 の培養に使用した培地は Starkey の半合成培地⁽¹⁾をやや改良した S 培地および Wickerham の合成培地⁽²⁾の無機成分、グルコース、ビオチンだけからなる W 培地および SW-C 培地である (Table I)。本研究では SW-C 培地組成を基本として実験目的に応じてその構成成分を増減したり、新たな成分を添加して使用した。ただし炭素源のブドウ糖含量は全実験を通して 3% とした。培地の初発 pH の調整および培養方法は前報⁽⁴⁾に従った。菌の生育量は 660 nm による濁度 (以下 O. D.₆₆₀ と略す) およびトーマ氏血球計数板による全菌数で測定した。また本報に記載した定常期の測定値はすべて培養 120 時間目の培養液から得た。

2. 脂質の定量法 脂質の抽出および定量は長沼らの方法⁽⁶⁾に従った。菌体の脂質含量は菌 10⁸ 個あたりの mg 値で示し、またこの値とそ

の時の培養液 1 ml 中の全菌数値と消費糖量から油脂生成率 $\{[(\text{生成された脂質量}(\text{mg})/\text{消費された糖量}(\text{mg})) \times 100]\}$ を算出した。

実験結果

1. MC 培地の決定

SW-C 培地を改良して MC 培地を決定するにあたり MC 培地として備えているべき条件を次のように定めた。

a) 構成する物質はすべて化学的に組成が明らかであってその量もあらかじめ知ることができること。

b) 培地を構成する成分の添加量は少なくとも陽イオンに関しては菌の正常な生育を支えるのに必要な成分だけから成り、その添加量は最少量であること。

c) 定常期における全菌数が 1.2×10^8 cells/ml 以上であること。

全菌数の条件は S および W 培地で菌を生育させた時に得られる値を基準とした。

藤谷ら⁽⁷⁾は清酒酵母の最大生育量を支えるのに必要な培地中の K, Mg 含量を報告しているが、これらはいず

Table I. Composition of Various Media

	S	W	SW-C	MC	ML
Glucose	30.0 g	30.0 g	30.0 g	30.0 g	30.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	3.5	1.25	3.25	3.25
KH ₂ PO ₄	1.0	1.0	0.31	0.31	0.31
KCl	—	—	23.0 mg	23.0 mg	23.0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	67.0	22.0	67.0
NaCl	0.1	0.1	—	—	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	0.1	—	—	—
FeCl ₃ ·6H ₂ O	—	200.0 μg	362.0 μg	362.0 μg	362.0 μg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	40.0	39.0	9.8	9.8
MnSO ₄ ·4H ₂ O	—	400.0	69.0	69.0	34.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	400.0	436.0	436.0	220.0
H ₃ BO ₃	—	500.0	—	—	—
KI	—	100.0	—	—	—
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	—	200.0	—	—	—
Biotin	—	2.0	0.2	0.2	0.2
Yeast extract	1.0	—	—	—	—
Dist. water	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
Initial pH	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

S medium and W medium were proposed by R. L. Starkey⁽¹⁾ as a semi-defined medium and by L. J. Wickerham⁽²⁾ as a defined medium, respectively. SW-C medium is a new defined medium determined in the previous paper⁽⁴⁾ and the amounts of inorganic salts, except for sulfate and chloride ions, are consistent with maximum amounts of ions consumed by *L. starkeyi* during growth in S medium. MC medium is a simple defined medium which supports normal growth of the cells. ML medium is a simple defined medium suitable for lipid production by the cells.

れも SW-C 培地中の濃度を上回っている事実を参考にして、主として多量成分⁽⁴⁾ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) に注目してその添加量の増加によって改良を試みた。

はじめに SW-C 培地の多量成分のうち、どの成分を増加させたら MC 培地の全菌数に関する条件を満たすかを検討した。予備実験で KH_2PO_4 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加量を増加させても全菌数はわずかしかな増大しなかったが、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を追添加すると顕著な効果が認められた。追添加量を増大させるに従って定常期の全菌数は増大し、SW-C 培地 1 l あたり $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 2.0 g 追添加 (全濃度として 3.25 g/l) すれば全菌数は当初目標とした 1.2×10^8 cells/ml に達した (Fig. 1)。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 添加量を 3.25 g/l, その他の多量成分は SW-C 培地の濃度に固定しておいて微量成分⁽⁴⁾ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) の添加量を検討した (Fig. 2)。基本とした SW-C 培地には多量成分に由来する SO_4^{2-} , Cl^- が多量に含まれているので、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (以後それぞれ Fe, Cu, Mn, Zn と略す) の濃度の効果として表わされた実質的内容はそれぞれ Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 濃度

Fig. 1. Effect of Additional Supply of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ into SW-C Medium on Total Cell Number of *L. starkeyi* at the Stationary Phase of Growth.

Total cell number was determined by direct count under a microscope using a hemacytometer. The composition of SW-C medium is described in Table I. *L. starkeyi* was cultured at 30°C with reciprocal shaking.

の効果といえる。SW-C 培地の Fe および Zn の添加量を減少させると全菌数は減少したが、Cu および Mn をそれぞれ単独に 9.8 $\mu\text{g/l}$ および 34.5 $\mu\text{g/l}$ まで減少させても全菌数は目標より上回っていた。しかし Cu および Mn を同時にこの濃度まで減少させると全菌数は目標より下回った。そこで、それぞれの添加量が無添加までさらに減少させた場合を比較すると、Cu の方が明らかに全菌数は高い値を示している、正常な生育に対する要求性は Mn より低いと考えられるので、ここでは Mn 添加量はそのままとして Cu だけを 9.8 $\mu\text{g/l}$ まで減少させるのが適当と判定した。この結果に基づき MC 培地の微量成分組成を決定した。この段階で再度多量成分の添加量を検討したところ、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の添加量を 22.0 mg/l まで減少させても全菌数は目標を上回っていた。以上の結果に基づき Table I に示したように MC 培地を決定

Fig. 2. Effect of Concentration of Various Minor Components in a Modified SW-C Medium on Total Cell Number of *L. starkeyi* at the Stationary Phase of Growth.

Culture conditions and the measurement of total cell number were the same as described in Fig. 1. The modified SW-C medium has the same composition of SW-C medium except for the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ being 3.25 g/l. (A): Effect of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (B): Effect of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, (C): Effect of $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (D): Effect of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Arrows in the figure indicate the concentrations of corresponding components in SWC medium.

Table II. Effect of Some Additives into SW-C Medium on Total Cell Number of *L. starkeyi* at the Stationary Phase of Growth

Medium		Total cell number
SW-C		0.97×10^8 cells/ml
SW-C + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g/l	1.25×10^8
SW-C + $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ^{a)}	1.4 g/l	1.22×10^8
SW-C + Mannitol	12.5 g/l	0.98×10^8

Culture conditions and the measurement of total cell number were the same as described in Fig. 1. The composition of SW-C medium is described in Table I.

^{a)} The content of NH_4^+ in commercial ammonium carbonate was previously determined by steam distillation and titration.

した。

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の追添加量によって定常期の全菌数が増大した原因が培地中の NH_4^+ イオン, または SO_4^{2-} イオンのいずれか一方の増加によるものであるか, あるいは培地の浸透圧が高くなったためであるかを明らかにする目的で, SW-C 培地に追添加した $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の代りに $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ またはマンニトールを添加して検討した (Table II)。なお市販の炭酸アンモニウムはあらかじめ NH_4^+ 含量を測定して $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を 2.0 g/l 添加したときと NH_4^+ 含量が同じになるように用いた。またマンニトールは本菌によって資化されないことはあらかじめ確かめておいた。その結果, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ が $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ に代置されても全菌数は同じ値を示したが, マンニトールの代置効果は認められなかった。したがって $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の追添加効果は NH_4^+ が増加した効果であると判定した。また SW-C 培地の成分のうち少なくとも陽イオンに関する限り 1 種類でも無添加にすると生育は明らかに悪くなるから (Fig. 2), すべての陽イオンが本菌の正常な生育にとって必要であると判定された。

2. ML 培地の決定

MC 培地を改変して ML 培地を決定するにあたり ML 培地が備えているべき条件を次のように定めた。

- 構成する物質はすべて化学的に組成が明らかであってその量もあらかじめ知ることができること。
- 定常期の脂質含量が $3.5 \text{ mg}/10^8 \text{ cells}$ 以上になること。
- 定常期の O.D._{660} が 10 以上になること。
- 定常期における全菌数が $1.2 \times 10^8 \text{ cells/ml}$ に近いこと。

Fig. 3. Effect of Concentration of Minor Components in MC Medium on Total Lipid Content of *L. starkeyi* at the Stationary Phase of Growth.

Total lipid was extracted with methanol-chloroform from the cells at the stationary phase and the content was determined gravimetrically. Culture conditions were the same as described Fig. 1. The composition of MC medium is described in Table I. (A): Effect of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (B): Effect of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, (C): Effect of $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (D): Effect of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Arrows in the figure indicate the concentrations of corresponding components in SW-C medium.

脂質含量はS培地で培養したときに得られる値を上回るように設定した。生育の条件はSおよびW培地で培養したときに得られる値を基準とした。

Fig. 2 の実験および長沼らの報告⁽⁸⁾から, 培地の微量成分濃度が菌の脂質含量に大きな影響を及ぼすことが予見されたので, ML 培地を決定するには主として微量成分の添加量を変化させて実験を行った。

Fe, Mn および Cu の添加量を SW-C 培地に添加した量の 1/4~1.5 倍まで増減させても菌体脂質含量はほとんど変化しないか, または減少した。それに対して Zn は培地に添加する濃度が減少するにつれて定常期の菌体脂質含量が増大した (Fig. 3)。Zn 濃度を MC 培地の 1/2 にすると定常期の脂質含量は $4 \text{ mg}/10^8 \text{ cells}$ 程度を示し, この時の O.D._{660} は約 11 であった。さらに Zn 濃度を

Fig. 4. Growth of *L. starkeyi* in Various Media.

Culture conditions and the method employed for the measurement of total cell number were the same as described in Fig. 1. Apparent growth was determined at a wavelength of 660nm by a Hitachi spectrophotometer Model 101. The composition of the media is described in Table I. The growth phase were classified according to the definition by Monod.

—●—: S medium, —○—: W medium,
—▲—: MC medium, —△—: ML medium.

減少させると脂質含量は増大したが O.D.₆₆₀ は 10 以下となった。したがって Zn 添加量は 220 μ g/l が最適であると判定した。またこの Zn 添加量の条件下では Mn は 1/2 (34.5 μ g/l) に減少させても生育および脂質含量に影響を与えなかった。以上の結果に基づき ML 培地の微量成分組成を決定した。一方、多量成分についても添加量を検討したが、MgSO₄·7H₂O を MC 培地の 3 倍程度 (67.0mg/l) に増加させるとわずかに脂質含量が増大した。以上の結果から、Table I に示したように ML 培地を決定した。

3. S, W, MC, ML 培地における供試菌の生育

Fig. 4 に S, W, MC, ML 培地に供試菌を生育させたときの生育曲線を O.D.₆₆₀ および全菌数で示した。

O.D.₆₆₀ では 4 種の培地の間に差がなく、また対数期、

Table III. Lipid Production by *L. starkeyi* in Various Media at the Stationary Phase of Growth

Medium	Lipid content	Fat coefficient
S	3.4 mg/10 ⁸ cells	13.5%
W	2.6	11.8
MC	1.9	8.2
ML	4.2	14.8

Culture conditions and the method for the determination of total lipid were the same as described in Fig. 1 and Fig. 3, respectively. The composition of the media is described in Table I. Fat coefficient means the percentage of the amount of the lipid produced to the amount of the glucose consumed by the cells.

減衰期、定常期になる培養時間にも差はなかった。一方、全菌数では培養 40 時間目までは 4 種の培地ではほぼ同一であった。その後も S, W, MC 培地では同一で定常期では 1.2 $\times$ 10⁸ cells/ml 程度を示した。ML 培地では 40 時間目以後になって菌数の増加に差が生じ、定常期で約 1.0 $\times$ 10⁸ cells/ml であった。また定常期の残糖を測定⁽⁴⁾したところ、4 種の培地とも全く認められなかった。

4. S, W, MC, ML 培地の菌体脂質含量および油脂生成率

Table III に S, W, MC, ML 培地で培養して定常期になったときの菌体脂質含量および油脂生成率を示した。

ML 培地を用いたときの菌体脂質含量は MC 培地を用いた時の 2 倍以上であり、S 培地あるいは W 培地を用いた場合よりも高かった。一方、油脂生成率は ML 培地で最も高くなり、MC 培地のその約 1.8 倍であった。Fig. 5 に定常期の菌の形態を示した。前記の 4 種の培地のいずれに培養した菌体にも脂肪球がみられたが、ML 培地に培養した菌の脂肪球は他の培地に培養した菌のそれに比較して明らかに大きかった。特に MC 培地に培養した菌の脂肪球と比較すると大きな差が認められた。

考 察

酵母の培養に用いる合成培地は Wickerham の合成培地をはじめとしていくつか知られている⁽⁹⁾。しかしそれらの培地を構成する各成分の添加量の決定理由についての明確な記載は見あたらない。われわれは「培養全経過を通じて観察された培地成分の最大消費量はその菌の生育に必要な成分量を反映する。」という仮定⁽⁴⁾のもとに *L. starkeyi* が正常な生育を示す最少培地組成の決定を

Fig. 5. Morphology of *L. starkeyi* Grown in Various Media at the Stationary Phase of Growth.

Culture conditions were the same as described in Fig. 1. The composition of the media is described in Table 1. (A) : S medium, (B) : W medium, (C) : MC medium, (D) : ML medium. OG means oil globule. Bar represents 5 μ m.

試みた。本菌は SW-C 培地では十分な生育を示さなかったが、SW-C 培地の NH_4^+ 添加量を増加させるだけで S および W 培地と同等な生育を示す MC 培地が決定された (Fig. 1)。したがって上述の仮定は NH_4^+ 以外の成分については妥当であった。清酒酵母が最高の増殖能を示すのに必要な K, Mg の濃度はそれぞれ 4 mM, 0.4 mM とされているが⁽⁷⁾, MC 培地ではそれよりも低くそれぞれ 2.4 mM, 0.09 mM であった。したがって MC 培地は *L. starkeyi* の正常な生育にとって特異的な組成を持つ最少培地であると考えられる。

ML 培地の決定にあたっては MC 培地の定常期の全菌数を維持しながら個々の菌体内脂肪球をさらに肥大させることを目指したが、実際に決定された ML 培地の全菌数は減衰期から MC 培地より低くなりはじめ、定常期では約 20% 低くなった (Fig. 4)。しかし本菌の全菌数の増加と脂肪球の肥大は減衰期から定常期にかけては同時

に起こる現象である⁽¹⁰⁾から、一定量の炭素源のもとでは 2 つの目的を同時に達成させるには限界があると推定される。この考えは生育が定常期に達した MC, ML 培地には残糖がなかったことでも支持される。

ML 培地に本菌を培養すると定常期の菌は S 培地の菌より大きな脂質含量を示し、油脂生成率は Starkey が本菌について報告した値 (12~13%)⁽¹¹⁾ よりも大きかった。それゆえ ML 培地は油脂生産を行わせるに適した培地であるし、本菌の生育にともなう脂肪球の形成肥大の生化学的機構に関する研究にも適当な最少培地であると考えられる。

一般に微生物が脂質をその菌体内に蓄積する場合は、培地の組成と培養方法によってその蓄積量は大きく変動する⁽¹¹⁾といわれている。しかし培地に加える微量成分濃度の影響を詳細に検討した研究報告は少ない。本報では培地に添加する Zn^{2+} 濃度が脂質含量に大きい影響を

手えることを明らかにした (Fig. 2). W, MC および ML 培地の脂質含量は MC, W, ML 培地の順に大きくなっていて, それらの培地の Zn^{2+} 濃度は MC, W, ML 培地の順に少なくなっていた (Table I). この結果は Zn^{2+} 添加量と菌体脂質含量との関係が MC と ML 培地間だけでなく, 他の合成培地へも拡大して適用できる可能性を示している.

要 約

(1) *L. starkeyi* の正常な生育のための最少培地 (MC 培地) を既報の SW-C 培地 (各成分が本菌培養中の最大消費量だけから成る培地) に NH_4^+ を増加して決定した. MC 培地の成分のうち少なくとも陽イオンはすべて本菌の正常な生育にとって必要であった. 添加成分およびその添加量から MC 培地は本菌の正常な生育にとって特異的な組成をもつ最少培地であると考えられた.

(2) 本菌が定常期において高い脂質含量を示す最少培地 (ML 培地) を MC 培地の Zn^{2+} 添加量を減少させて決定した. ML 培地で培養した場合の本菌の生育, 脂質含量および油脂生成率を既存の培地と比較した結果, ML 培地は本菌の脂肪球形形成肥大の研究に, また脂質生

産の研究に最適な最少培地であると結論された.

なお本報告の概要は昭和 49 年度日本農芸化学会大会において発表した.

- (1) R. L. Starkey : *J. Bacteriol.*, **51**, 33 (1946).
- (2) 本江元吉 : 微生物工業 (朝井勇宣編), 朝倉書店, 1956, p. 451.
- (3) D. A. Whitworth and C. Ratledge : *Process Biochem.*, **9**(9), 14 (1974).
- (4) 是永 博, 長沼孝文, 兎束保之, 田中健太郎 : 農化, **50**, 9 (1976).
- (5) L. J. Wickerham : *Tech. Bull. No. 1029*, U. S. Dept. Agr. Washington, D. C. (1951).
- (6) 長沼孝文, 兎束保之, 田中健太郎, 古賀哲郎 : 農化, **49**, 335 (1975).
- (7) 藤谷 健 : 醸協, **62**(2), 104 (1967).
- (8) 長沼孝文, 兎束保之, 田中健太郎 : 昭和50年度農化大会講演要旨集, 1975, p. 131.
- (9) Erkki Oora : *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1197 (1974).
- (10) 袖山政一, 兎束保之, 田中健太郎 : 農化, **46**, 495 (1972).
- (11) John D. Weete : "Monographs in Lipid Research," Vol. 1, ed. by David Kritchevsky, Plenum Press, New York and London, 1974, p. 16.