酵母 *Candida tropicalis* pK233 培養液の抗酸化能西原 浩[§], 緒方恭子, 谷 喜雄*, 山田幸子*, 平野博之**, 小牧久時**

香川大学教育学部化学教室

* 聖母女学院短期大学

** (株)生農研

Antioxidative Ability in Culture of Yeast *Candida tropicalis* pK233Hiroshi Nishihara[§], Kyoko Ogata, Yoshio Tani*, Yukiko Yamada*,
Hiroyuki Hirano** and Hisatoki Komaki**

Department of Chemistry, Faculty of Education, Kagawa University, 1-1 Saiwai-cho, Takamatsu 760-8522

* Seibojogakuin Junior College, 1 Fukakusatani-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-0878

** Seinoken, 1-17-1 Hakushima, Mino 563-0012

Ability of scavenging reactive oxygen species (ROS) in yeast *Candida tropicalis* pK 233 was investigated. Ethanol causes pseudohyphal development in *C. tropicalis* pK 233 in the absence of myo-inositol. Antioxidative ability of samples was investigated through of scavenging ability for DPPH and O₂⁻. Oxidation-reduction potential (ORP) of the culture without ethanol decreased with cell growth until 24 h and then gradually increased, while that with 4% ethanol decreased with cell growth until 48 h and remained at the decreased level. The cell culture grown with 4% ethanol showed strong scavenging ability for DPPH radical and O₂⁻, compared to that of without ethanol; this scavenging ability of ROS by the culture with 4% ethanol increased with cultivating time until 120 h. The cell culture grown with both ethanol and inositol was also able to scavenge ROS in a similar manner to that grown with 4% ethanol alone; yeast cells could be grown under these conditions. Thus, ethanol appears to enhance antioxidative ability in *C. tropicalis* pK 233 regardless of the presence of inositol and cell morphology.

(Received Oct. 20, 2008; Accepted Jan. 13, 2009)

Keywords: yeast, *Candida tropicalis*, antioxidation, ethanol, dimorphism**キーワード**: 酵母, エタノール, 抗酸化能, 二形性

好氣的生物が生存するためには酸素の存在は欠かせないが、体内に入った酸素の一部が活性酸素になる。活性酸素は人体の細菌からの防御、生化学反応、細胞分裂等の生体制御に関与し、有用な機能を持っているが、標的分子を酸化し、生物障害を与える等、人体に有害な作用も示す。人体はこれを抑える防御機能 (SOD 等) を備えているが、防御機能を上回る活性酸素が生じるとガンを始めとする生活習慣病を引き起こす可能性がある。これまで多くの抗酸化物質や抗酸化能をもつ食品¹⁾²⁾が報告されている。一方、微生物による抗酸化物質の研究は糸状菌 (カビ)³⁾⁴⁾で行われており、酵母についてはグルタチオンの効果等⁵⁾が報告されている。

さまざまに分化した細胞構造をもつ真核生物のうち真菌

類の栄養細胞は通常、菌糸型か酵母型のいずれかの形態をもつが、この形態を二つともとりうる一群の真菌類が存在する。これらの菌は生育環境に応じて菌糸型または酵母型のいずれかの形態を示し、しかも発育相は相互に可逆的に移行するいわゆる二形性を示すものである。さきに谷、山田らは炭化水素資化性菌である酵母 *Candida tropicalis* pK233 を n-アルカンを炭素源とした合成培地で培養すると仮性菌糸型の生育をするが炭素源をグルコースにすると酵母型の生育をすることを認め、さらにグルコースを炭素源とした培地での仮性菌糸型形成条件を検討した結果、エタノール 2~4% を添加し、かつイノシトールを含まないグルコース培地では仮性菌糸型の生育をすることを報告した⁶⁾。またこの仮性菌糸型培養条件ではタンパク質をはじめ種々の菌体内成分が液中に漏洩することを認めた^{7)~9)}。その一つであるグルタチオンは強い還元性をもつので本報告では *C. tropicalis* pK233 を基本培地にエタノール、イノシトール添加、無添加の条件下で培養し、その培養調製液

[†] 760-8522 香川県高松市幸町 1-1* [†] 612-0878 京都府京都市伏見区深草田谷町 1** [†] 563-0012 大阪府箕面市白島 1-17-1[§] 連絡先 (Corresponding author), nishihar@ed.kagawa-u.ac.jp

Table 1 Composition of semi-synthetic medium (per l)

Component	Weight	Component	Weight
D-Glucose	50 g	MnSO ₄ 4~6H ₂ O	0.0025 g
Casamino acids	5 g	FeCl ₃ 6H ₂ O	0.0025 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	Thiamine HCl	0.06 mg
Citric acid	2 g	Riboflavin	0.024 mg
K ₃ citrate	10 g	Pyridoxine HCl	0.24 mg
KH ₂ PO ₄	0.55 g	p-Aminobenzoic acid	0.12 mg
KCl	0.425 g	Nicotinic acid	1.2 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.125 g	Ca pantothenate	0.12 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.125 g	Biotin	1.4 mg

Inositol : 0 mg or 25 mg

Ethanol : 0 ml, 20 ml or 40 ml

Table 2 Composition of reaction mixture for assay of ability of reducing DTNB

Reagent	Volume
0.1 mol/l NaK-phosphate buffer (pH 7.1)	100.2 ml
1 mmol/l EDTA2Na	48.0 ml
DTNB solution (39.6 mg DTNB and 15.0 mg NaHCO ₃ is dissolved in 5 ml of 0.1 mol/l NaK-phosphate buffer (pH 7.1))	1.8 ml
Total	150.0 ml

中の抗酸化能を検討した結果を述べる。

実 験 方 法

1. 酵母培養法

C. tropicalis pK233 を Table 1 に示す半合成培地 20 ml に 50 µg-dry cells/ml の濃度で接種し、30℃ でエタノール、イノシトール添加、無添加の条件下で振盪培養した。

2. 測定試料の作成

下記の処理をした 3 種類の測定試料を用いた。

上清 培養液を 2000 rpm で 10 分遠沈して得られた上清
上清 (加熱) 上記で得られた上清をオートクレーブで 105℃, 10 分加熱したもの

培養液加熱処理液 培養液をオートクレーブで 105℃, 10 分加熱、遠沈して得られた上清

3. 試料の還元能および活性酸素消去能の測定

・DTNB 還元能

試料による DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) 還元能は Jocelyn¹⁰⁾ の方法に準じて調べ、グルタチオン (還元型) 量として表した。Table 2 に示す反応液 2.5 ml に試料 0.5 ml を加え、室温で 5 分放置後、412 nm における吸光度を測定した。

・DPPH ラジカルの消去能¹¹⁾

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) ラジカルは常温で安定なラジカルで、このラジカルは抗酸化物質の存在で消去されるので一般にラジカル消去能の指標とされる。

Table 3 Assay system for measuring ability of scavenging DPPH and O₂⁻

(A) DPPH

Reagent	Volume
Sample	0.1 ml
0.5 mol/l Na-acetate buffer (pH 5.5)	0.1 ml
Ethanol	1.9 ml
0.02 % DPPH in ethanol (w/v)	0.5 ml
H ₂ O	0.4 ml
Total	3.0 ml

(B) O₂⁻

Reagent	Volume
50 mmol/l NaK-phosphate buffer (pH 8.0)	2.0 ml
3 mmol/l EDTA2Na	0.1 ml
1.5 mmol/l WST-1	0.1 ml
3 mmol/l xanthine	0.2 ml
Sample	0.5 ml
Total	3.0 ml

Table 3 (A) に示した反応液を 25℃ で 30 分間保温し、必要に応じて遠沈し、得られた上清の 520 nm における吸光度を測定し、残存する DPPH 量を求め、反応液に加えた DPPH 量との差から消去された DPPH 量を求めた。

・スーパーオキシドアニオンの消去能¹²⁾

xanthine oxidase をキサンチンに作用させ、生じる O₂⁻ を WST-1 に反応させ、438 nm に吸収のある WST-1 ホルマザンを生成した。反応系に試料を加えて、WST-1 ホルマザンの生成が減少すれば O₂⁻ の消去能があることを示す。Table 3 (B) の反応液を 36℃ で 30 分間保温し、438 nm における吸光度を測定し、生成した WST-1 ホルマザン量を求め、試料を加えないときに生成した WST-1 ホルマザン量との差 (WST-1 ホルマザン生成抑制量) を求め、O₂⁻ 消去能の指標とした。

実験結果および考察

1. *C. tropicalis* pK233 の酸化還元電位 (ORP) の経時変化

エタノール無添加および 4% 添加培地で培養した上清、上清 (加熱)、培養液の ORP の経時変化を Fig. 1 (A) および Fig. 1 (B) に示した。

エタノール無添加培地では菌体の増殖と共に各試料とも ORP は低下したが、その後徐々に増加した。これは菌体の増殖と共に培養液の溶存酸素が減少し、その後増殖の停止により増加したものと思われる。エタノール 4% 添加培地では培養初期に ORP は大きく低下した。これは菌体が菌糸型で生育したため、溶存酸素濃度が大きく減少したためであろう。エタノール無添加の場合と異なり、その後 ORP

Fig. 1 Time-course of oxidation-reduction potential
Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium in the absence of inositol. Samples were prepared from culture of 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after inoculation. ORP of each sample was estimated.
(A) 0% ethanol, (B) 4% ethanol

は上昇せず、一定もしくはさらに低下する傾向が見られた。これはエタノールの添加により何らかの理由で培養液の還元性が増大したためではないかと考えられる。

2. DTNB 還元能に及ぼす培地中のエタノールの効果

C. tropicalis pK233 はイノシトール欠如下でエタノールを添加した培地では仮性菌糸型で増殖し、その時多量のグルタチオンを生産することが報告されている⁷⁾。グルタチオンには強い DTNB 還元能があり、その定量に利用される。そこでエタノール無添加および 2%, 4% エタノール添加培地で増殖した *C. tropicalis* pK233 の DTNB 還元能を比較した。

Fig. 2 (A) に示すようにエタノール無添加培地では DTNB 還元能は見られなかったが、エタノール 2%, 4% 添加培地

Fig. 2 Ability of reducing DTNB

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium in the absence of inositol. Ability of reducing DTNB by each sample was estimated.

(A) ethanol (0%, 2% and 4%), 120 h, (B) Time-course, 4% ethanol

ではかなり強い還元能が認められた。そこでエタノール 4% 添加培地における DTNB 還元能の経時変化を調べた。

Fig. 2 (B) に示すように培養時間が長くなるほど DTNB 還元能は強くなり、72~120 時間目ではほぼ最高に達した。

この DTNB 還元能は酵母が生成したグルタチオンによる可能性があるが、グルタチオン以外の還元性物質や抗酸化物質が生成することも考えられる。抗酸化活性の測定法¹³⁾¹⁴⁾はいろいろあるが、比較的簡便に分光光度法で測定できることから、DPPH ラジカル消去能および O_2^- 消去能を調べることによって試料の抗酸化能を測定した。

3. DPPH 消去能に及ぼす培地中のエタノールの効果

Fig. 3 (A) に示すようにエタノール無添加および 2% 添加培地でも若干の DPPH 消去能 (培養液加熱抽出液) が見られたが、4% 添加培地で強い DPPH 消去能が認められ

Fig. 3 Ability of scavenging DPPH

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium in the absence of inositol. Ability of scavenging DPPH by each sample was estimated.

(A) ethanol (0%, 2% and 4%), 120 h, (B) Time-course, 4% ethanol

た。また DPPH 消去能は上清や培養液を加熱すると強くになった。

次にエタノール 4% 添加培地における試料の DPPH 消去能の経時変化を調べた。エタノール 4% 添加培地における DPPH 消去能は、Fig. 3 (B) に示すように培養時間の経過とともに次第に強くなった。

4. スーパーオキシドアニオン消去能に及ぼす培地中のエタノールの影響

次にスーパーオキシドアニオン (O_2^-) 消去能に対するエタノールの効果を調べた。Fig. 4 (A) に示すようにエタノール存在下 (2%, 4%) で増殖した菌体からの試料はエタノール無添加と比べて強い O_2^- 消去能を示した。そこでエタノール 4% 添加培地における O_2^- 消去能の経時変化を調べた。

Fig. 4 Ability of scavenging O_2^-

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium in the absence of inositol. Ability of scavenging O_2^- by each sample was estimated.

(A) ethanol (0%, 2% and 4%), 120 h, (B) Time-course, 4% ethanol

エタノール 4% 添加培地における O_2^- 消去能は Fig. 4 (B) に示すように経時的に強くなった。上清を加熱したり、培養液を加熱抽出した試料は、未加熱の上清より強い活性を示した。

5. DTNB 還元能に及ぼすイノシトールの影響

上記のようにイノシトール欠如でエタノールを添加した培地で菌糸型に生育した培養液に強い還元能や活性酸素消去能があることが認められたので、次にエタノールの効果に及ぼすイノシトールの影響と菌体の形態変化の関係について検討した。

Fig. 5 に示すように、イノシトールの有無に拘らずエタノール添加培養液には DTNB 還元能が認められた。イノシトール欠如培地で生育した酵母は菌糸型、イノシトール添加培地で生育した酵母は酵母型であった。従って酵母の

Fig. 5 Effect of inositol on ability of reducing DTNB

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium for 120 h in the absence or presence of inositol (4% ethanol). Ability of reducing DTNB by each sample was estimated.

Fig. 6 Effect of inositol on ability of scavenging DPPH

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium for 120 h in the absence or presence of inositol (4% ethanol). Ability of scavenging DPPH by each sample was estimated.

形態には関係なくエタノールがDTNB還元能を増強させることが分かった。

6. DPPH 消去能および O_2^- 消去能に及ぼすイノシトールの影響

同様の実験をDPPH消去能および O_2^- 消去能についても行った結果、いずれの場合でもイノシトールの存否に拘らずエタノールの効果が認められた (Fig. 6, 7)。

DTNBを還元する物質をすべてグルタチオンとすると、本菌株は4%のエタノールを加えた培地では、グルタチオンをおよそ試料1ml当たり0.3~0.5μmol生成した (Fig. 2)。データは示していないが、このグルタチオン量では本菌から得られた試料の示したDPPH消去量の数分の1しか消去できず、また O_2^- を消去することはできないので、グルタチオン以外の抗酸化物質の存在が示唆され、その本体について現在検討中である。予備的な検討で試料を透析すると抗酸化能が失われることから、本菌の示す抗酸化物質は分子量が1万以下の低分子物質であると考えられる。本菌の示す抗酸化能は概して上清を加熱すると活性が増大した。これは本菌の生成する抗酸化物質が熱に安定な低分子物質であることを示唆している。加熱により活性が増大した機構については現段階で詳細に述べることはできないが、例えば抗酸化物質が他の分子と結合した形で菌体外へ漏洩し、加熱処理により結合が外れ、活性化されることも考えられる。今後詳しく検討しなければならない課題である。

酵母の生理に対するエタノールの阻害作用は古くから知られているが、その主な阻害作用として増殖、生存性、発酵速度等が示されている¹⁵⁾¹⁶⁾。酵母細胞に対するエタノールの主な攻撃部位は細胞質膜や細胞小器官の膜であり、エタノールによる酵母活性の阻害は解糖系やアルコール生成

Fig. 7 Effect of inositol on ability of scavenging O_2^-

Cells of *C. tropicalis* pK233 were grown in semi-synthetic medium for 120 h in the absence or presence of inositol (4% ethanol). Ability of scavenging O_2^- by each sample was estimated.

に関わる酵素活性に不可欠な補因子や補酵素の細胞内からの漏洩、種々の細胞内のタンパク質や解糖系酵素の変性、グルコース、マルトース、アンモニウム、アミノ酸の輸送の阻害等様々な機構によって起こることが報告されている。しかしエタノールによる酵母の抗酸化能の増大や抗酸化物質の生産はほとんど知られていない。今後本研究をベースに本菌におけるエタノールの作用機序や抗酸化物質の検討を進めていきたい。

要 約

C. tropicalis pK233 をイノシトール欠如培地でエタノールを加えて培養すると仮性菌糸型で増殖するとともに菌体内成分の漏洩量が増加することから、この菌体培養液の抗酸化能を、エタノール無添加増殖菌体 (酵母型) の培養液と比較した。エタノール無添加培地では増殖後急激に ORP が低下し、その後徐々に増加した。一方、エタノール添加培地では増殖後 ORP が低下し、その後も増加しなかった。エタノール無添加培地に比べて、エタノール添加培地の培養液は強い DPPH ラジカル消去能と O_2^- 消去能を示した。本菌はイノシトール含有培地にエタノールを加えると酵母型で増殖するが、イノシトール欠如培地と同様に強い活性酸素消去能を示したので、菌の形態に関係なく、エタノールが本菌の抗酸化能物質の生産を促したと思われる。

文 献

- 1) 藤本健四郎, 食品と抗酸化物質, 「抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御」, 初版, 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真編, (学会出版センター, 東京), pp. 107-115 (1994).
- 2) 大澤俊彦, 酸化ストレス制御因子含有植物素材の探索と評価システム, 食科工, **52**, 7-18 (2005).
- 3) Ishikawa, Y., Morimoto, K. and Hamasaki, T., Metabolites of Eurotium species. *J. Food Sci.*, **50**, 1742-1744 (1985).
- 4) 阿部尚樹, 微生物由来抗酸化物質のラジカル捕捉メカニズム, 化学と生物, **38**, 5-7 (2000).
- 5) Marchler, G., Schuller, C., Adam, G. and Ruis, H., A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.*, **12**, 1997-2003 (1993).
- 6) Tani, Y., Yamada, Y. and Kamihara, T., Morphological

change in *Candida tropicalis* pK233 caused by ethanol and its prevention by myo-inositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 351-355 (1979).

- 7) Yamada, Y., Tani, Y. and Kamihara, T., Production of extracellular glutathione by *Candida tropicalis* pK233. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 3275-3278 (1984).
- 8) Uejima, Y., Yamada, Y. and Tani, Y., Production of extracellular mannan by *Candida tropicalis* pK233. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **27**, 481-486 (1986).
- 9) Yamada, Y., Yamaguchi, A., Tani, Y. and Misaki, A., Extracellular mannan produced by *Candida tropicalis* pK233. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2389-2390 (1986).
- 10) Jocelyn, P.C., The effect of glutathione on protein sulphhydryl groups in rat-liver homogenates. *Biochem. J.*, **85**, 480-485 (1962).
- 11) Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
- 12) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S. and Sawamura, M., Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485-488 (1999).
- 13) Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., Standard methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
- 14) 島村智子, 松浦理太郎, 徳田貴志, 杉本直樹, 山崎 壮, 松藤 寛, 松井利朗, 松本 清, 受田弘之, 酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験, 食科工, **54**, 482-487 (2007).
- 15) van Uden, N., Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Annu. Rep. Ferment. Processes*, **8**, 11-58 (1985).
- 16) D'Amore, T., Panchal, C.J., Russell, I. and Stewart, G.G., A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **9**, 287-304 (1990).

(平成 20 年 10 月 20 日受付, 平成 21 年 1 月 13 日受理)