

報 文

Rhodotorula 属に関する研究 (第4報)*Rhodotorula* 属菌のビタミン要求性 (1)

長谷川 武治・坂野 勲 (財団法人 醸造研究所)

酵母類がビタミンを要求する事実については, WILDIERS 以来すでに数多くの報告が発表された。また, その分類学上の意義については SCHULTZ, ATKIN²⁾あるいは WICKERHAM³⁾などによつて論ぜられている。*Rhodotorula* 属菌株のビタミン要求性についても SCHOPFER⁴⁾, ROBBINS, MA,⁵⁾ MILLER, ASCHNER⁶⁾ および SKINNER, HUXLEY⁷⁾の研究があるが, さきに著者らの1人が発表した *Rhodotorula* 属の修正分類法⁸⁾ において設定された Species 間, または Species の内部で, 各菌株のビタミン要求性がどのような関係を示すかを明かにする目的で本実験を行なつた。

実 験 方 法

1. 使用菌株

第2報で使用した各菌株およびその Culture, この Culture とは, 醸造研究所保存菌株 (第1表で IFO 番号のついたもの) と同一の原株から分株され, 本邦の他の研究機関で保存されて来た標本を指す。このものは菌番号の前に Cul. の記号をつけた (第2報⁹⁾ 参照)。

2. ビタミン要求試験

Basal medium ; (NH₄)₂SO₄ 0.25%, あるいは Vitamin free casein hydrolyzate (カザミノ酸) 0.3%
KH₂PO₄ 0.1, MgSO₄·7aq 0.05
CaCl₂·2aq 0.01, NaCl 0.01
Glucose 3.0, Distilled water 7ml

Concentration of vitamins ;

Biotin 0.2r%, Ca-pantothenate 40.0r%,
Thiamine HCl 40.0, Inositol 200.0,
Nicotinic acid 40.0, p-Aminobenzoic acid 200.0,
Pyrimidine HCl 40.0, Riboflavin 20.0,

Yeast-glucose-agar (Yeast ex. 1%, Glucose 3%, Potato 10%, Agar 1.5%) 上に4日間, 24~25°Cで培養した菌体を集め, 殺菌した塩類溶液を用い4回以上洗浄したのち, 全体を適当な濃度の細胞懸濁液とし, その1滴をそれぞれ硫安およびカザミノ酸を窒素源とする, 試験管内の2種の培養基へ接種し28°Cで培養する。接種量は細胞数で約10⁸/mlとした。これと同時に全く同じ条件でビタミンのみを除いた2種類の培養基へ細胞を接種し, 同様に培養を行う。各培養基における発育の程度は CORLMAN 比色計で測定した Optical density を比較してこれを知り, その測定値を比較してビタミンの影響を検討した。表中の各数値は次式に従つて得られた。

$$R = \frac{VF}{VA} \times 100$$

R=growth ratio

VF=Optical density in vitamin-free medium

VA=Optical density in vitamin-added medium

結 果

各菌株の培養は2週間にわたつて行われた。ビタミン添加培地の中では, 培養が長くなると, Pellicle または Ring を形成する場合が少なくなき, 測定が困難になる。そこで, Optical density の測定は接種後7日目に行

Table 1

Species	Strains and cultures	R in the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium	R in the casein-medium
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rht. glutinis</i> NCYC, 59	89	100
	<i>Rht. gracilis</i> NRRL, Y-1091	73	70
	<i>Torula sugamii</i> , NI, 7208	100	83
	<i>T. miniata</i> , NI, 7197	80	70
	<i>Rht. lusitamica</i> , CBS, L-324	89	80
	<i>T. koishikawensis</i> IFO, 0386 ; Cul, 30	100 ; 83	100 ; 75
	<i>T. rubescens</i> IFO, 0413 ; Cul, 0388 Cul, 2 ; 3 ; 4	88~100	80~100
	<i>T. rufula</i> , IFO, 0416	73	75
	<i>T. saitoi</i> , IFO, 0395 ; Cul, 0414 Cul, 5 ; 6 ; 8 ; 10	70~90	70~90
	<i>Rht. glutinis</i> var. <i>aurantiaca</i> CBS, L-320	29	29
	<i>Rht. glutinis</i> var. <i>dairenensis</i> IFO, 0415 ; Cul, 14	30 ; 33	31 ; 43
<i>Rhodotorula rubra</i>	<i>Cryptococcus ruber</i> NCYC, 68	38>	33>
	<i>Cryptoc. rubrorugosus</i> NRRL, Y-843 NCYC, 64 IFO, 0004	0 18 10	8 10 10
	<i>Cryptoc. pararoseus</i> NRRL, Y-844 IFO, 0003	17 20	0 20
	<i>Blastodendron carbonei</i> IFO, 0001	22	24
	<i>Blastod. simplex</i> IFO, 0002 ; Cul, 0714	17 ; 20	14 ; 8
	<i>T. mucilaginoso</i> NCYC, 63 RIFY, 7729 NRRL, Y-168	10 14 26	8 0 30
	<i>T. corallina</i> IFO, 0406 ; Cul, 0382	10 ; 30	8 ; 22
	<i>T. sanguinea</i> NCYC, 65 NCYC, 66 NRRL, Y-174	12 0 22	33 25 27
	<i>T. sanguinea</i> (?) IFO, 0712 ; Cul, 18	0 ; 0	0 ; 0
	<i>T. decolans</i> IFO, 0383 ; Cul, 0696	20 ; 25	25 ; 25
	<i>Rhodotorula minuta</i> IFO, 0367 ; Cul, 20	3 ; 5	0 ; 5
	<i>Rhodotorula pallida</i> CBS, L-320	0	0

い、それ以後は肉眼による観察で数値に矛盾のないことを確かめた。ビタミン無添加培養基の方でわずかでも発育による混濁が認められた場合には、かならずその培養から2滴を各培養基へ新らしく移植して実験を繰返した。しかし著者らの実験方法では2回のR値の差はきわめて小さく、結果としては実験誤差以上の相違は認められなかった。以上の結果を第1表に掲げる。実験に使用した菌株のなかで、*Cryptococcus ruber*, NCYC-68株は、ビタミン添加培養基中でRingの形成が早く、そのために正確な数値をうることができなかつた。

考 察

この実験の基本培養基として硫安ならびにカザミノ酸をそれぞれ窒素源とする2種類の培養基を選んだのは、最近酵母の増殖におけるアミノ酸とビタミンの相互作用について種々の知見が得られているからである。

高橋⁹⁾⁻¹¹⁾は数株の *Saccharomyces cerevisiae* (醸造用酵母) がビタミンを除去した混合アミノ酸培養基には生育せず、硫安のみを窒素源とし、同じくビタミンを除いた培養基には生育したこと、アミノ酸培養基におけるこれらの酵母の生育にはビタミンの添加が必要であることおよび硫安培養基に添加した10種類のアミノ酸がいずれも酵母の発育を阻害したが、この阻害は Pantothenate の添加によつて除かれることなどを報告している。以上の結果は、その後福井ら¹⁴⁾によつて追試され、同様の事実が確認された。これらの報告では、ビタミンを含まない場合には、アミノ酸培養基よりも硫安培養基の方がすぐれていたことが述べられているが、この実験の結果では、2種の培養基上の菌株の生育には一般にほとんど差異が認められず、またR値もビタミン要求度の高い菌株の場合に多少の相違があるとしても、かなりよく一致している。ビタミン要求性の検討について接種菌量の影響¹¹⁾¹²⁾が知られているので、著者らもあらかじめこの点について検討したが、7日目の観察時にはほとんどその差異を認めることができなかつた。これら2種の培養基上のR値から次の事実が指摘される。*Rhodotorula glutinis* 群の各菌株では、R値がいずれも70以上で、このSpeciesはビタミンの生成について autotrophic であると認められる。これに対してその2つの変種を含むその他の種類では、*Rht. glutinis* に比較して明瞭な相違が認められた。すなわちこれらの菌株はいずれも40以下のR値を示すので、明らかにビタミン要求性が存在する。同一株から出た数個の Culture の間では、Culture によつてビタミン要求度に多少の相違が認められたが、これが多年の継代培養の過程における変化によるものかどうかは、現在のところ明らかでない。

以上の結果から今後の実験には組成の簡単な硫安培養基を選ぶのが適当と考えられるので、この実験の結果についても一応硫安培養基上の数値に基づいてまとめ、各 Culture のビタミン要求度を Species 毎に区分して第2表に掲げた。ただし基本的要求性 (Essential requirement) の判定についてはカザミノ酸培養基上の数値を参照し、両培養基上でR値5以下のもののみをとり、硫安培養基上でだけ5以下を示した場合は括弧で囲んで付け加えた。

Table 2

VF/VA × 100	100~70	40~20	20~10	5~0
<i>Rht. glutinis</i>	19strains			
<i>Rht. glutinis</i> var. <i>aurantica</i>		1		
<i>Rht. glutinis</i> var. <i>dairenensis</i>		1		
<i>Rht. rubra</i>		9	8	2 (2)
<i>Rht. minuta</i>				2
<i>Rht. pallida</i>				1
Degree of vitamin requirement	No	Stimulative		Essential

第2表を見ると、各 Species の間にはかなり明瞭な差異が認められる。ビタミン要求性を用いて酵母を分類した報告には、たとえば、BURKHOLDER¹⁾らが110種類の既知酵母163株を20のTypeに分けた例があるが、特定のGenusにおける各 Species の相互関係をこの方面から検討したものは、現在までのところ見当たらない。しかしWI-

CKERHAM²⁾はその *Hansenula* 属に関する研究のなかで、多くの場合ある Species が特定のビタミンまたはその2つ以上に対して欠落性を持つことが明らかなきは、この性質は分類のための指標になりうるだろうと論じている。ただし多数の同種の株を比較することは必要である。たとえば環境要因によりビタミンの要求性に变化を生ずる場合が知られているが、その多くは異常なあるいは人工的な誘発要因¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾によるもので、これらを区別することが可能な場合には分類学上にも何らかの寄与を期待しうると考えられる。

要 旨

Rhodotorula 属29株 (42標本) についてビタミンの要求性を検討した。その結果修正分類法における *Rht. glutinis* (Fres.) HARRISON em. HASEGAWA は非要求種であること、その2つの変種および硝酸塩非利用群の各菌はいずれも要求性を現わすことなどが知られた。

文 献

- 1) BURKHOLDER, P.R., McVEIGH, I. and MOYER, D. : J. Bact. **68**, 385 (1944).
- 2) SCHULTZ, A.S. and ATKIN, L. : Arch. Biochem. **14**, 369 (1947).
- 3) WICKERHAM, L.J. : Technical Bulletin, USDA No. **1029**, 13 (1951).
- 4) SCHOPFER, W.H. : Compt. Rend. Acad. Sc. **205**, 495 (1937).
- 5) ROBBINS, W.J. and MA, R. : Science **100**, 85 (1944).
- 6) MILLER, G. and ASCHNER, M. : J. Gen.

(174) (長谷川, 坂野) *Rhodotorula* 属に関する研究 (第5報)

Microb. 6, 361 (1952). 7) SKINNER, C.E. and HUXLEY, M.J.: Mycologia 48, 371 (1956). 8) 長谷川武治: 本誌, 36, 200 (1958). 9) 高橋雅弘: 日本農芸化学会誌, 28, 398 (1954). 10) 高橋雅弘: 日本農芸化学会誌, 30, 140 (1956). 11) 高橋雅弘: 日本農芸化学会誌, 30, 145 (1956). 12) 佐藤正弘, 山田一弥, 植村定治郎: 日本農芸化学会誌, 30, 492 (1956). 13) 佐藤正弘, 斎藤恭子, 植村定治郎: 日本農芸化学会誌, 31, 684 (1957). 14) 福井三郎, 谷喜雄, 岸部忠信: 本誌, 34, 369(1956). 15) LEONIAN, L.H. and LILLY, V.G.: J. Bact. 45, 329 (1943). 19) LEONIAN, L.H. and LILLY, V. G.; Science 95, 658 (1942). (昭和 34, 2, 24 受理)

Rhodotorula 属に関する研究 (第5報)

Rhodotorula 属菌のビタミン要求性 (2)

長谷川武治・坂野 勲 (財団法人 醸造研究所)

前報¹⁾において, 著者らは *Rhodotorula*属 菌株のビタミン要求を検討したが, その結果を分類学上から見れば, *Rhodotorula glutinis* (FRES.) HARRISON emend. HASEGAWA が非要求種であるのに対し, その他の種または変種にはいずれも明瞭な要求が認められた. 本報では, これらのビタミン要求群の各菌株につきその要求するビタミンの種類を検討した結果について報告する.

実験方法

前報¹⁾記載の基本培養基と8種のビタミン類を使用し, まず, 全部のビタミンを含む培養基 (C-培地) と各ビタミンをそれぞれ1つずつそれから除去した8種の培養基 (D-培地) をつくり, 前報と同様に処理した各菌株を細胞数で約 10^8 /mlの濃度に接種した. 要求の度合を測るのに, 接種後7日目に各種D-培地とC-培地とに生じた濁度の比を用い, その100倍数が5以下の場合を基本的要求性 (Essential requirement), 40以下の場合を促進的効果 (Stimulative requirement) と判定した. なお, これに続き, 基本培養基へそれぞれの菌株が要求したビタミンを添加し, 各菌株ごとに接種試験を行つて結果を確認した (表中, 基本的要求性をE, 促進的効果をSの記号を用いて表わし, これらが疑わしい場合は括弧で囲んだ).

結果

以上の結果を一括して表示する. *Rhodotorula* 属のビタミン要求性はこれを2つの type の群に分けることができた. 第1群は Thiamine によつて促進的効果を与えられるもので *Rht. rubra* および *Rht. glutinis* var. *dairiensis* がこれに入る. *Rht. rubra* に属する *Cryptococcus rubrorugosus*, NRRL, Y-843, *Torula sanguinea*, NCYC, 66の2菌株は硫安培養基上できわめて強い要求を Thiamine に対して現わしたが, 前報¹⁾における Casein hydrolyzate 培養基上の結果から見て基本的要求と決定し難いものがあるので, これらは表中では (E) の記号で表わした. また同じ Species のなかで *Torula sanguinea*? (SAITO's strain) が Thiamine を要求せず, Nicotinic acid に対する基本的要求性を持つことはきわめて特異的である. *Rht. glutinis* var. *aurantiaca* はいずれの培養基でも生育が不良で, はつきりした結果を得ることができなかつたので省略した.

第2群は p-Aminobenzoic acid (PABA) に対して基本的要求性を現わすもので, そのほかに Thiamine によつても促進的効果を示す.

Rht. minuta および *Rht. pallida* がこれに入る.

考 察

SCHOPFER²⁾は *Rht. rubra* についてまた MILLER and ASCHNER は *Rht. mucilaginosus* についてピミタンの要求性を検討し, これらが Thiamine, とくにその Pyrimidine 部分によつて生育を促進されると報告したが, 著者らの結果もこれとよく一致した. Thiamine に対する要求性は *Rhodotorula* 属においては, *Rht. glutinis* を除き普通な性質と認められる. 植村ら¹¹⁾は醤油の諸味から分離した多数の酵母がいずれも Thiamine によつて促進的効果を現わした点について, この種の酵母が Thiamine 合成能力を有していてもその生育の誘導期にはさらに多量の Thiamine を要求するのであろうと説明した. *Rhodotorula* 属の場合 *Rht. glutinis* はビタミンに対して