

Rhodotorula minuta の生育およびカロチノイド生成 におよぼす光の影響

多田幹郎・白石正英

(生物化学研究室)

Received November 1, 1977

The Influence of the Light Illumination on the Growth and the Carotenoid Formation of *Rhodotorula minuta*

Mikiro TADA and Masahide SHIROISHI

(Laboratory of Biological Chemistry)

The influence of the light illumination on the growth and the carotenoid formation of *Rhodotorula minuta* were studied.

The results obtained were summarized as follows :

1) The multiplication of *Rh. minuta* was slightly inhibited by the light illumination with the intensity of 8000 lux, and was ineffective at the light intensity less than 5000 lux.

2) The carotenoid formation of *Rh. minuta* was highly influenced by the light illumination, although the consumption of glucose and L-valine, oxygen uptake were little affected.

3) It appeared that the carotenoid content of the cell depended upon the light intensity of the illumination, regardless of the total exposure energy.

4) The illumination of light ranging from 400nm wavelength to 500nm markedly accelerated the carotenoid formation of *Rh. minuta*. From this result, it is assumed that a certain yellow pigment in the cell served as a photoreceptor for the photobiological response.

緒 言

カロチノイド生合成能を有する *Rhodotorula* 属酵母の生育とカロチノイド生成がその培養条件によって影響を受けることはよく知られている¹⁾。前報²⁾において、*Rh. minuta* の生育とカロチノイド生成に及ぼす培養基質の影響について調べたが、その実験において、培養時の光照射の有無により菌体のカロチノイド生成量に著しい差が生じることを認めた。

LEDERER³⁾は *Rh. rubra* のカロチノイド色素の生成が光によって刺激されることを見だし、PRAUS⁴⁾は *Rh. gracilis* のカロチノイド生合成が光によって促進され、しかも生合成されるカロチノイドの組成比も光照射によって変化することを報告している。一方、中川ら⁵⁾は *Rh. sp.* のカロチノイド生成量は光によって影響されないことを認め、また BOBKOVA⁶⁾は *Rh. glutinis* のカロチノイド生成は弱光で促進され、強光で阻害されると報告している。このように *Rhodotorula* 属酵母のカロチノイド生成への光照射の影響は種によって、その現われ方が異っている。

本報では *Rh. minuta* のカロチノイド生成と照射光強度および光の種類との関係について検討するとともに、菌体の生育、窒素源及び炭素源の消費に及ぼす光の影響の有無につい

ても併せて検討した。

方 法

菌種および培養基質 供試菌種は *Rhodotorula minuta* (SAITO) HARRISON, IFO1102 を使用した。その培養基組成は前報²⁾での結果を参考にして、水 1 l 中にグルコース 3 g, L-バリン 2.2 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, NaCl 0.5 g, FeCl_3 10 mg, 酵母エキス 1.0 g, チアミン塩酸塩 50 mg, P-アミノ安息香酸 10 mg を含む溶液とし、斜面培養の場合はこれに 15 g の寒天粉末を加えた。

培養方法 液体培養は 500 ml 容坂口フラスコに 100 ml の培養液を入れて種菌を接種し、照射光源を上部に取り付けた恒温振盪培養機（高崎製作所）で、26°C で振盪培養を行った。斜面培養での実験の場合には、18×180 mm の試験管に 7 ml の寒天培地を入れ、その斜面の表面積が 14~15 cm² になるように斜面を形成する、この斜面でにきるだけ一様になるように菌体を接種し、恒温室で 26°C の温度条件下で静置培養した。

照射光源と照射方法 光の質についての実験に用いた以外の光源には白色蛍光灯（ナショナル FL-20D-SDL）を用いた。この光源で培養基の温度上昇を伴わないで得られる最高照

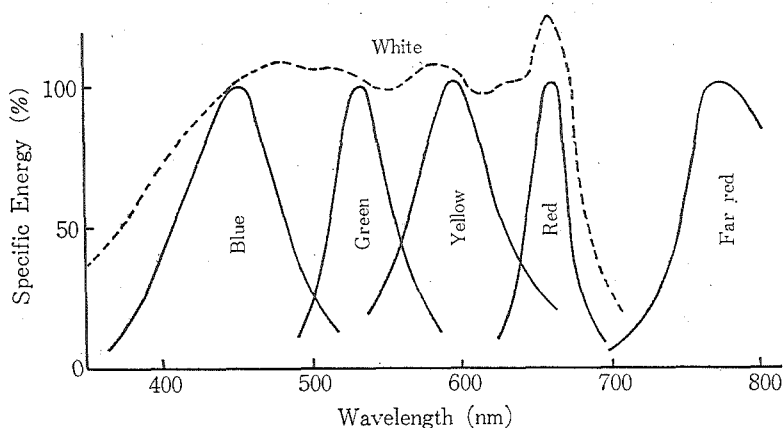


Fig. 1 Energy distribution of lights used for the illumination.

度は 8000 lux であった。光の種類に関する実験に用いた光源は近赤外光以外についてはナショナル着色蛍光灯（青色，緑色，黄色，赤色）を使用し，近赤外光はタングステン電球を光源として，青色，緑色，紫色の三種のセロファンを重ねて作成したフィルターを通して得た。これら光源から得られる光の波長分布を Fig. 1 に示しておいた。培養時の照度または照射率は光源からの距離を変えるかあるいは薄い黒のナイロンメッシュで遮光することによって調節し，照度計（東芝 5 号）または熱量計（光合成有効日射計，PSZ-1，東芝）で測定した。

菌体重量の測定 培養液から一定量を取り，遠心分離（7000 rpm. × 5 分）で菌体を集め水に懸濁した後比濁²⁾によって乾燥菌体量を求めた。斜面培養の場合，寒天表面から水で菌体を洗いだして集め，上述の方法で測定した。

カロチノイドの抽出と定量 前報²⁾で述べたように，菌体の凍結乾燥物を一定量採取して物理的に破砕する。カロチノイドを脂溶性溶媒で抽出して，その抽出液について吸光度

を測定し、全カロチノイドを *torulene* 換算量として算出した。

糖及びアミノ酸の定量 培養液の一部を取り、遠心分離によって菌体を除いた上澄について、グルコースについてはソモジーネルソン比色法、L-バリンについてはニンヒドリン比色法によって定量した。

結 果 と 考 察

菌体生育への影響 一般に強い光は生物の生育を阻害し、時には死に致らしめることが知られているので *Rh. minuta* について培養時の照度を 0, 5,000, 8,000lux として菌体生育の経時変化を液体培養および斜面培養について調べた。その結果を Fig. 2 に示す。液体

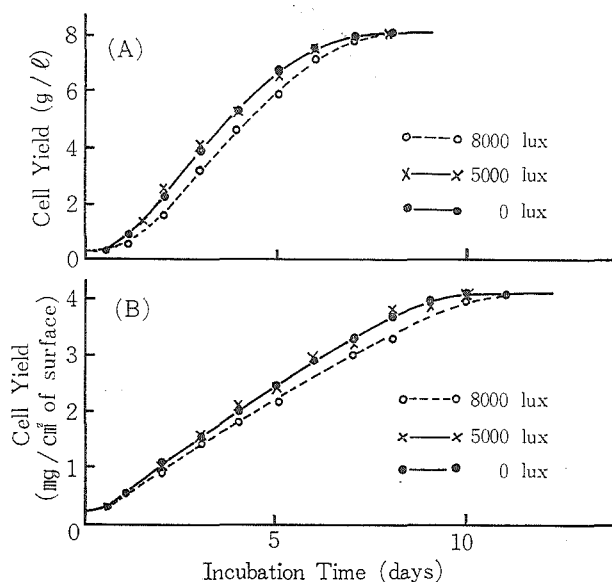


Fig. 2 Effect of the light illumination on the growth of *Rh. minuta*.

(A) Shaking culture in liquid medium.

(B) Standing culture on agar slope.

振盪培養における菌体の生育は約12時間の *lag* の後、対数期となりほぼ直線的に増加し、約6日後に定常期に達する。5,000lux の照度下での菌体増殖は暗黒下での生育と差はないが、8,000lux での生育は幾分阻害を受ける。この阻害は培養初期に現われ、その後の増殖率は暗黒条件と差はない。したがって定常期に達するのが約半日遅れることとなるが最終菌体量には差がない。斜面培養については約12時間の *lag* ののち、液体培養に比べて著しく低い増加率で約10日間もの長い対数期を示した。この場合の菌体量は寒天斜面 1 cm^2 当りの mg 数で示しているが、最終菌体収量は培地 1 l について約 8 g となり液体培養に相当する。斜面培養における光の影響は液体培養と同様に 5,000lux では全くなく、8,000lux で阻害が現われる。この阻害は液体培養の場合と異り対数期の増殖率が低下し、その結果として定常期に達するのが約2日程度遅れるが、最終菌体量は同程度となる。これらの結果から、*Rh. minuta* の生育は 5,000lux 以下の照度の白色光照射によって影響を受けないが、8,000lux 以上の照度では生育が阻害されることが認められる。また液体培養と斜面培養での影響の差

については、液体培養において酵母は常に移動しており、光の直接照射を受けない機会が多いのに対して、斜面培養では常時光の直接照射を受けることも1つの原因と考えられる。

グルコース、バリンの消費への影響 後述するように *Rh. minuta* に光照射すると、菌体のカロチノイド生成量は著しく増加する。このような現象は菌体の生育生理に変化が生じることを予想させる。従って菌体増殖に影響を与えない5,000luxの照度下で液体培養を行い、培養基中のグルコース、L-バリンの消費を調べ暗所培養での結果と比較検討した。

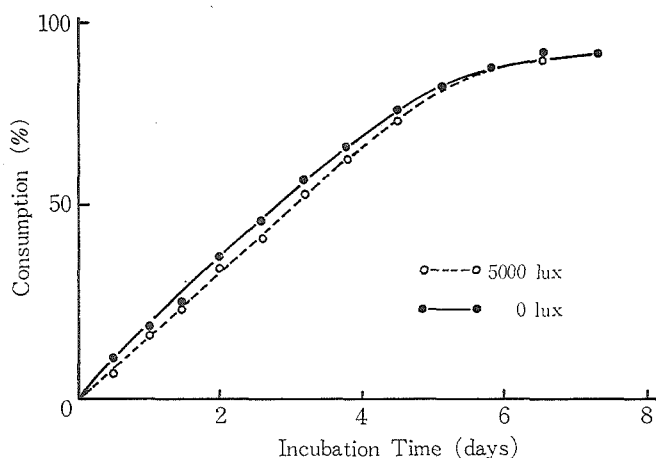


Fig. 3 Effect of light illumination on the consumption of glucose.

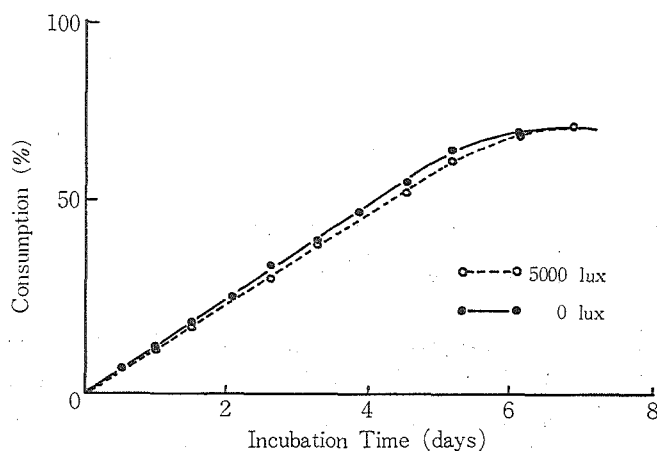


Fig. 4 Effect of the light illumination on the consumption of L-valine.

Fig. 3, Fig. 4に示したように、グルコース、L-バリンの消費は共に光によって差がないことが認められた。またグルコースを基質とした時の酸素吸収量をワールブルグマノメーターで測定した結果、光の照射の有無によって有意差は認められず、呼吸商も共に1.0であった。

菌体の形態への影響 暗所培養菌体と5,000luxの照明下で培養した菌体について光学顕微鏡でその大きさを測定した結果、両者には差はなく、共に長径5.2μ、短径3.4μの楕円で

あり、また菌体重量にも差がなかった。

カロチノイド生成への影響 光照射は *Rh. minuta* の生育、生理、形態に大きな影響を与えないにもかかわらず、カロチノイド生成量には著しい影響が認められることはすでに述べたが、その影響の程度は照射する光の強さによると考えられる²⁾ので照射程度が 0, 2,000, 4,000, 6,000, 8,000 lux の 5 段階の条件下で 7 日間液体培養して得た菌体のカロチノイド量を測定した。その結果は Table 1 に示すように、カロチノイド生成量はそれぞれ 18 μ g, 120 μ g, 142 μ g, 159 μ g, 172 μ g であり、照度の高い照射菌体ほどより高い生成量を示した。また 2,000 lux の照明下で 12 日間培養した菌体のカロチノイド含有量は 122 μ g であった。これらの結果は菌体のカロチノイド含有量は与えられる光エネルギーの総和には関係なく、単位時間当りの光エネルギー量に支配されるという考え方を支持するものである。暗所培養菌体を光を極力さける条件下で植え継ぎ、長期間に渉って培養してそのカロチノイド含有量を測定した結果、13

Table 1 Effect of the light intensity on the carotenoid formation in *Rh. minuta*.

light intensity	carotenoid content
0 lux	18 μ g/g
2000	120
4000	142
6000	159
8000	175

~18 μ g の量は必ず存在していた。これらの結果から *Rh. minuta* のカロチノイド生成には光を必須としないが、光はカロチノイド生成を刺激し、かつ促進させることが考えられ、LEDERER³⁾、PRAUS⁴⁾の報告と一致する。PRAUS は光がカロチノイド生成量のみならず生成カロチノイドの組成にも影響を与えることを *Rh. gracilis* について認めている。もしも PRAUS の報告と同程度の組成変化が *Rh. minuta* にも生じているならば、暗所培養菌体および明所培養菌体から得たカロチノイドの吸収スペクトルに差が現われるはずである。しかし全カロチノイドの定量に際して測定した吸収スペクトルは何れの菌体においても同一の吸収スペクトルを示した。従って *Rh. minuta* についてはカロチノイドの組成に変化があったとしても少いと考えられるが、最終的にはカロチノイドの分別定量を行なわねばならない。

カロチノイド生成に及ぼす光の質の影響 生物が光刺激に感応する機構を考えると、まず第 1 に光を感知しなければならない。この為に生物体中には光受容体が必ず存在しているであろう。そしてこの光受容体はどのような波長の光をも吸収するものではなく、限られた領域の光のみを吸収する色素である。光がカロチノイド生成を刺激しかつ促進する *Rh. minuta* においても光受容体としての色素が存在しているはずである。この光受容体に関する知見を得る目的で、Fig. 1 に示した波長分布をもつ光の照射条件で 6 日間液体振盪培養した菌体のカロチノイド生成量を測定した。この場合の照射光強度は 6,000 $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Sec}^{-1}$ に揃えた。この照射光強度は白色蛍光灯では約 400 lux である。Table 2 に結果を示し

Table 2 The carotenoid contents of *Rh. minuta* grown under the illumination of various lights.

light	carotenoid content
dark	17 μ g/g
blue light	125 μ
green light	74
yellow light	31
red light	22
far red light	19
white light	89

Light intensity of all illuminations was 6000 $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

た。550nm以上の光（黄色光，赤色光，近赤外光）にはカロチノイド生成の促進効果はなく，青色光に強い促進効果が認められた。これらの結果から，カロチノイド生成の促進効果には高等植物の光形態形成反応に関与しているファイトクロームは関係しておらず，光受容体としては400nm～500nmに極大吸収を示す黄色色素がその役割を果していることが明らかである。*Rh. minuta*の菌体にはカロチノイド以外の黄色色素としては，かなり多量のリボフラビンおよびその誘導体が存在しているが，それらが光受容体としての役割を果しているのか，または別の黄色色素が存在し，それが光受容体なのかについては今後の研究にまたねばならない。

摘 要

*Rh. minuta*の生育とカロチノイド生成への光照射の影響を調べる目的で，照射光の光強度および光質を異にする条件下で菌体を培養して，増殖，炭素源及び窒素源の消費，酸素吸収量ならびにカロチノイド含有量を調べた。その結果は次のようである。

- 1) 菌体の増殖は5000lux以下の光強度ではほとんど影響を受けないが，8000luxの照射によって幾分阻害が認められた。
- 2) *Rh. minuta*のカロチノイド生成は光照射によって著しく影響されるにもかかわらず，グルコース，L-バリンの消費には殆ど変化が認められなかった。
- 3) 菌体のカロチノイド含有量は照射された光の全エネルギーとは関係なく，照射光強度にのみ支配されているように考えられた。
- 4) *Rh. minuta*のカロチノイド生成は400nm～500nmの波長帯を有する光でのみ著しく促進された。この結果から，菌体内に存在するある種の黄色色素が光生物学的感応に関与する光受容体としての機能を有しているものと推論される。

文 献

- 1) SIMPSON, K. L. and H. J. PHAFF: The Yeasts (ANTHONY, H. R. et al eds.), 493—515, Academic Press, London and New York (1971)
- 2) 多田幹郎・白石正英: 岡山大農学報 50, 87—94 (1977)
- 3) LEDERER, E.: C. r. hebdomadaire Seances Acad. Sci. 197, 1964—1965 (1933)
- 4) PRAUS, R.: Chem. Listy 46, 643—645 (1952)
- 5) 中川昌平・辰巳忠次: 農化 34(3), 195—198 (1965)
- 6) BOBKOVA, T. S.: Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1, 320—325 (1965)