

## *Mucor rouxianus* の Dimorphism の生理学的研究

### II 脂 肪 代 謝

西 上 一 義

Physiological Studies on Dimorphism of *Mucor rouxianus*

II. Fat Metabolism of *Mucor rouxianus*

Kazuyoshi NISHIGAMI

Department of Biology, Shimane University, Matsue, Japan  
(Received November 30, 1967)

#### Abstract

Gas metabolism and fatty acid synthesis were studied in *Mucor rouxianus* by inoculating in various gas phases. This organism grown aerobically showed comparatively small  $Q_{O_2}/Q_{CO_2}$  value in endogenous respiration. But the value became bigger than 1.00 in case glucose added exogenously to this organism. In cells of *M. rouxianus* aerobically grown, [fatty acid mg/dry wt. mg] value reached to about 11 %. Fatty acids constituting fat, included in the cells were lauric acid (C<sub>12</sub>), myristic acid (C<sub>14</sub>), palmitic acid (C<sub>16</sub>), stearic acid (C<sub>18</sub>), oleic acid (C<sub>18:1</sub>), and linolic acid (C<sub>18:2</sub>). These higher fatty acids were found more in cells aerobically grown. But in cells anaerobically grown by carbon dioxide, those higher fatty acids were little found except myristic acid, palmitic acid, and palmitoleic acid.

糸状菌は培養条件によって顕著な二形性をしめす。この現象は多くの研究者達により興味を持たれ、かなり以前より種々の菌について調べられている。*Mucor* 属の二形性に関しては古く Berkely, Bail 等により初期の研究が行われ、やや近年になって Lüers 等 (1929) の詳細な研究がある。さらに最近では Nickerson (1949a, 1949b), Bartnicki (1961, 1962a, 1962b, 1962c, 1933) 等の一連の業績がある。筆者は *Mucor rouxianus* を嫌気的条件下において生長させ、その際に生ずる形態変化に附随する生理的变化を調べ、若干の知見を得たのでここに報告する。

本文に入るに先だち、脂肪酸の分析をこころよく引き受けていただいた、鳥取大学医学部 何川涼教授ならびに山田高路博士に深く感謝の意を表す。

## 材料および方法

## 材料

実験に用いた *Mucor rouxianus* は東大応用微生物研究所 から分譲された。

## 培養基

stock culture は馬鈴薯培養基, preculture は YPG 培地を使用した。その組成は次のとおりである。

酵母エキス	3 g
ペプトン	10 g
グルコース	20 g
蒸溜水	1000ml
pH	4.5
培養温度	30°C

**嫌気培養** 二酸化炭素または窒素をもって嫌氣的培養をする際には、右図のような 300ml 丸底フラスコ中に培養液 150ml を入れて静置培養した。ガス交換は真空ポンプで空気を抜き使用ガスを充填する操作を 3 回繰り返しておこなった。

**好気培養** reciplocating shaker を使用した。

**脂質の定量** Soxhlet 脂肪抽出器を用いた。

**脂肪酸の定性** 日立 KGL-2A 型ガスクロマトグラフを使用した。充填剤は Succinate polyester, carrier gas 窒素は  $0.6\text{kg/cm}^2$  の圧力で流した。試料室温度は  $250^\circ\text{C}$ 。column 温度は  $180\sim 187^\circ\text{C}$  で分析をおこなった。

**脱水素酵素実験** 脱水素酵素の実験には Thunberg 管を使用した。その内容液は次の組成である。

主室	水素供与体	1.0ml
	緩衝液	( $6.7 \times 10^{-2}\text{M}$ 酸性フタル酸緩衝液)
	pH 4.5	0.4ml
	メチレン青溶液 ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ )	0.1ml

側室 菌懸濁液

反応温度  $30^\circ\text{C}$



## 実験結果

Methylene blue 脱色時間 好氣的に培養した *M. rouxianus* が Methylene blue を脱色

する時間を比較測定した。その結果、ブドウ糖、エチルアルコール、乳酸、クエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸等を基質にして比較的短時間に脱色をした。特にコハク酸を基質にした場合は短時間であった。アルコールおよび乳酸の脱色も短時間であった。(第1表)

Table 1. Methylene blue reduction time by aerobically cultured *M. rouxianus*

substrate	endogenous	glucose	ethanol	lactate	citrate	$\alpha$ -keto glutarate	succinate	fumarate	malate
time	23'	10'	2'11"	2'20"	15'	12'	2'	15'	20'

ガス代謝 振盪培養(好氣的), 静置培養(やや嫌氣的), 二酸化炭素培養(嫌氣的), 窒素培養(嫌氣的)によって *M. rouxianus* を培養した際の菌体のガス代謝能を Warburg Manometer で測定した(第1図)。振盪培養によって得た菌体の endogenous respiration では酸素の排出はすくなく  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  は 1 以下であった。これにブドウ糖を加えると酸素呼吸の増加は僅かであるが、二酸化炭素の排出は著しく増大する。静置培養の endogenous respiration では、酸素の吸収もかなり認められるが、さらに二酸化炭素の排出量が非常に大きいことが特徴である。これにブドウ糖を与えると、酸素吸収はあまり増大しないが、二酸化炭素の発生には明瞭な添加効果が認められる。 $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  は 3~4 という大きな値となった。二酸化炭素を封じて嫌氣的に培養すると、増殖する菌は全部酵母形細胞になる時もあるが、たまたま菌糸状の細胞が混在する時もある。この両者を分別してそれぞれガス代謝能を測定してみた。菌糸状細胞では  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  は約 2 という値をしめた。ブドウ糖添加効果は酸素吸収には全く認められなかったが二酸化炭素の排出には顕著な促進効果があった。他方酵母形細胞では、ガス代謝能が弱く特に酸素の吸収量がすくなかった。ブドウ糖の添加効果は明瞭に認められた。窒素嫌氣培養で得られた菌糸状細胞も弱いガス代謝能しか持たなかった。特に酸素吸収能は弱かった。ブドウ糖添加効果も二酸化炭素発生にわずかながら認められたのみである。振盪培養および二酸化炭素で嫌氣的に培養した菌のしめす  $Q_{CO_2}$ ,  $Q_{O_2}$  および  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  を endogenous とブドウ糖添加の状態で測定した結果は次のとおりである。すなわち嫌氣培養で得た菌の en-

Table 2. Activity of glucose catabolism by aerobically and anaerobically cultured *M. rouxianus*

	culture condition	aerobic			anaerobic		
endogenous	$Q_{CO_2}$	8.9	7.2	3.6	7.7	11.2	11.4
	$Q_{O_2}$	13.3	9.2	5.0	10.3	10.8	13.5
	$Q_{CO_2}/Q_{O_2}$	0.67	0.78	0.72	0.75	1.03	0.85
glucose	$Q_{CO_2}$	33.2	11.5	28.5	29.5	35.5	43.7
	$Q_{O_2}$	33.2	12.5	19.4	16.9	25.4	28.2
	$Q_{CO_2}/Q_{O_2}$	1.00	0.92	1.47	1.75	1.40	1.55

dogenuous では  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  は平均 0.88 となった。ところが好氣的に培養した菌でも平均 0.72 という小さな値となった。ところがこれにグルコースを与えると、嫌氣培養菌では平均 1.57, 好氣培養菌でも 1.13 となった (第 2 表)。

気相および pH と増殖量 種々の気相条件によって得られる菌の収量が調べられた。またそれぞれの条件下で得られた菌の脂肪含量は好氣的条件のものほど含有量が高いということがわかった。カビ類は一般にやや酸性寄りの pH において活発に増殖をするものであるが、あまり pH が低くなり、4.5 ともなると脂肪合成能が低下するという報告もあるので pH と脂肪量 / 菌乾燥量をしらべた。その結果、脂肪合成最適 pH は 5.0~5.5 にあることがわかり pH 4.5 にもなお活発な合成がおこなわれることがわかった (第 3, 4 表)。

脂肪分析 ガスクロマトグラフを使用して *M. rouxianus* の生産する脂質の脂肪酸分析をおこなった。その結果 pH 4.5 で培養されたものも pH 5.0 で培養したものも脂肪酸組成は全く変りなく、マレイン酸, プロピオン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸等が主成分として検出された (第 2 図)。ところが気相条件の相異によって得られる脂肪酸はかなり変化することが判った。何れにせよ得られた脂肪酸の主成分はラウリン酸, マレイン酸, プロピオン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸等である。好氣的条件で得られるものでは  $C_{12} \sim C_{14}$  の脂肪酸含量は比較的少量で  $C_{18}$  のステアリン酸, オレイン酸, リ

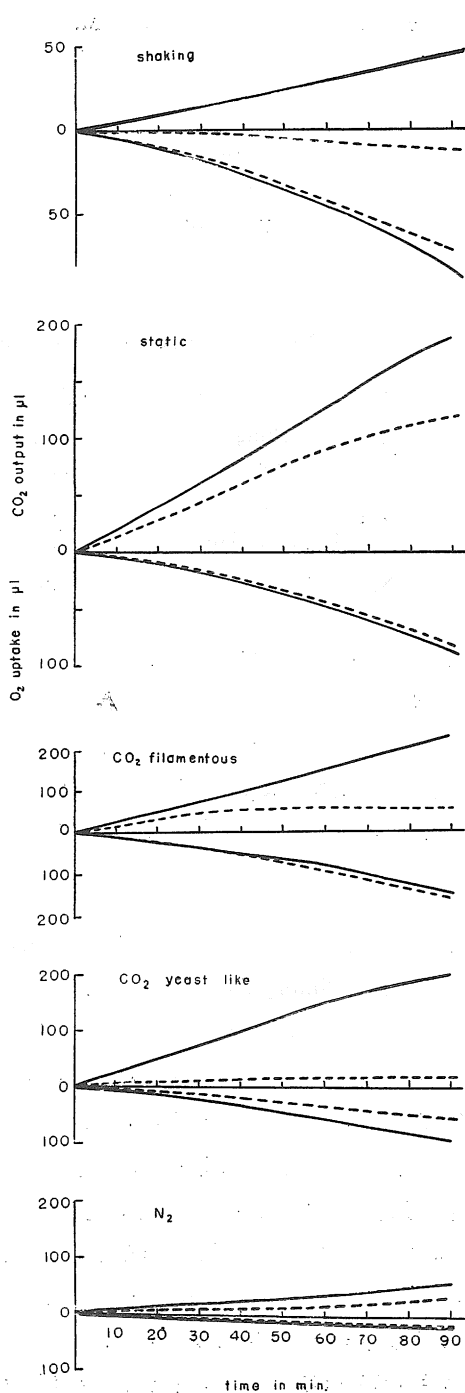


Fig. 1. Gas metabolism by the cells of *M. rouxianus* incubated on various conditions.

Table 3. Lipid productivity of *M. rouxianus* incubated in various conditions

culture condition		dry wt. g/medium 1l	lipid %
air	shaking	7.74	11.3
	static	2.28	8.28
CO <sub>2</sub>	filamentous	0.525	3.56
	yeast like	0.177	2.26
N <sub>2</sub>		0.747	3.69

Table 4. Effect of pH on lipid formation by *M. rouxianus*

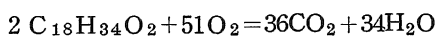
culture condition		pH 4.5	5.0	5.5	6.0
air	shaking	10.37%	11.12%	11.27%	10.46%
	static	7.53	7.31	8.28	7.42
CO <sub>2</sub>	filamentous	2.54	3.00	3.56	2.53
	yeast like	3.55	0.98	2.26	1.22
N <sub>2</sub>		2.02	3.53	3.69	3.08

ノール酸等が比較的多量に存在する。これに対して二酸化炭素で嫌氣的に培養したものではマレイン酸 (C<sub>14</sub>) , ラウリン酸 (C<sub>12</sub>) およびさらに炭素原子の少い脂肪酸が比較的多量に検出されるが, C<sub>18</sub>の脂肪酸ではオレイン酸が検出されたのみである。窒素培養で得た菌では成分脂肪酸の種類も少なく, 高分子の脂肪酸はパルミチン酸 (C<sub>16</sub>) , およびパルミトオレイン酸 (C<sub>16</sub>) のみであった。他にミリスチン酸 (C<sub>14</sub>) の比較的高いピークが認められた。

### 考 察

*M. rouxianus* の持つ特殊性は Dimorphism をしめすということである。一般に糸状菌は種々の要因で Dimorphism をしめすが通常の好氣的培養では菌糸を作り, 二酸化炭素で嫌氣的に培養すると酵母形の球状細胞を作る。同じ嫌氣培養でも窒素による培養では酵母形細胞は作らず菌糸状になる。この mechanism については Bartniki 等の広範な実験と仮説があるが、いまだ決定的な説明は得られていない。

一般の微生物は嫌氣的に培養すれば  $Q_{CO_2} / Q_{O_2}$  は大きくなる。逆に好氣的に培養すれば  $Q_{CO_2} / Q_{O_2}$  は小さくなる。この菌は嫌氣的に培養したのもでも endogenous の場合に0.72という低い値を得た。またブドウ糖を与えると好氣的に培養した菌は平均1.13という比較的大きい値となった。これは endogenous に際しては脂肪系の物質を基質としているということ, またブドウ糖を与えた時に高い値となったことより, Table 1 にしめすようにアルコールや乳酸の脱色時間が短いことから若干の発酵酵素系の活性も考慮に入れる必要もあるが, 脂肪酸の合成がおこなわれているのではないかということも考えさせる。



oleic acid

RQ = 0.7

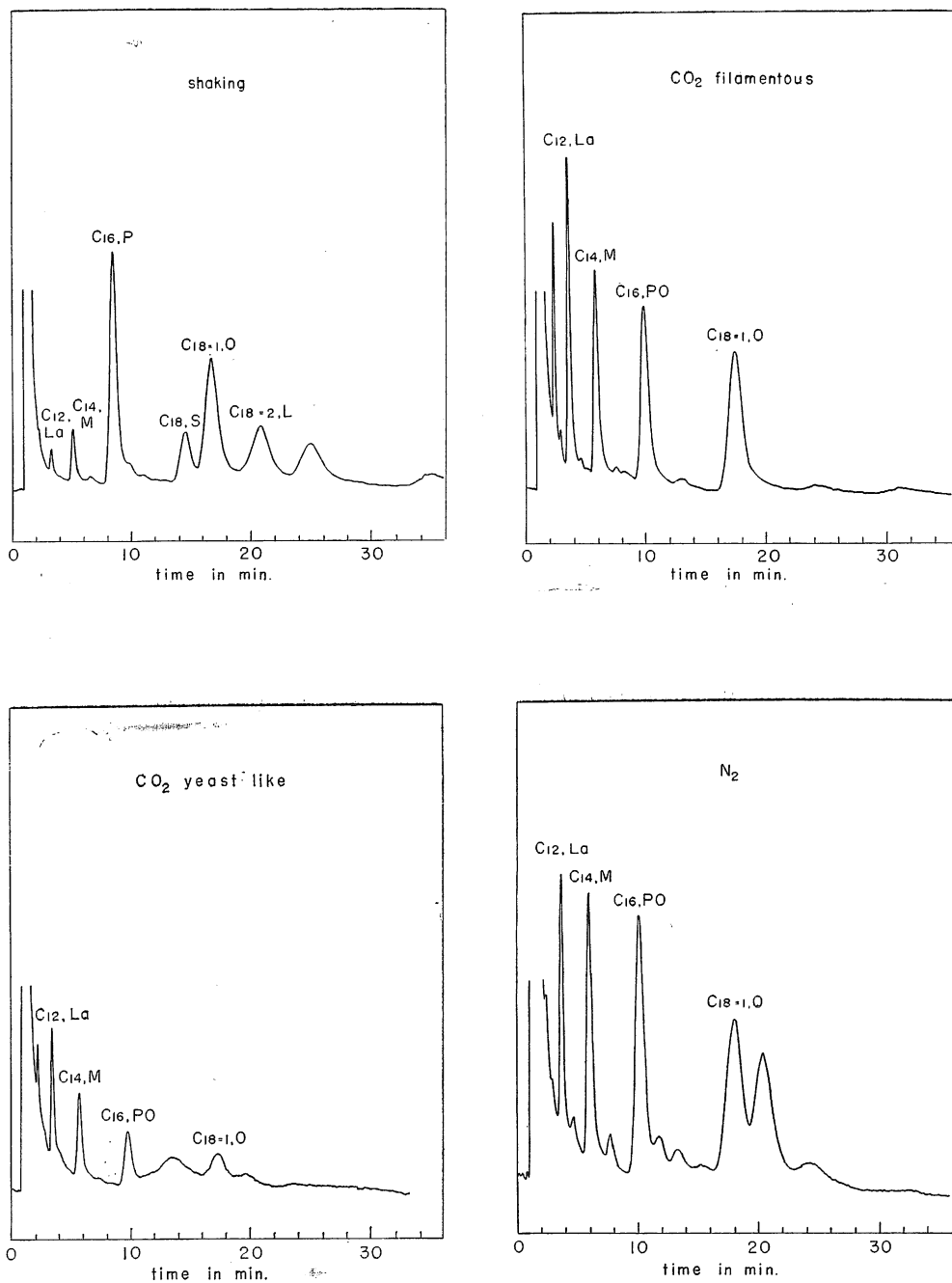
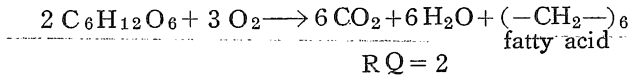


Fig. 2. Analysis of fatty acids included in the cells of *M. rouxianus* incubated on various conditions.



*M. rouxianus* のしめすガス代謝より上式のごとく細胞内で脂肪酸の合成分解が活発におこなわれているのではないかということ推測してみた。そこで、 Soxhlet 脂肪抽出器を使用して菌体内の脂質の定量をおこなった。その結果、 *M. rouxianus* は細胞内にかなり多量の脂質をもつことが判明した。特に好氣的に培養した菌では乾燥量の11%にもおよぶ量の脂質が含まれていた。この脂質量は嫌氣条件で培養した細胞では比較的少量が得られたのみである。このように気相の相異によって脂質の収量は著しく変化するのであるが pH の変化によっても影響を受けるものかを調べたが、 pH 4.5~6.0 の範囲内では殆ど大差が無く、わずかに5.0~5.5 の範囲内に最適点があるよううかがわれた。細胞の脂肪合成能は pH 4.5 附近で著しく低下するという報告もあるが、 *M. rouxianus* は好氣的条件に置きさえすれば、極めて活発に脂質を生産した。

次に生産された脂質を構成する脂肪酸の種類を調べたのであるが、培養液の pH の変化による相異は殆ど認められなかった。他方、気相条件の変化による構成脂肪酸成分は明らかに異なったものとなった。好氣的条件のもとに生長した菌には、低級脂肪酸も存在するが、ステアリン酸 (C<sub>18</sub>)、オレイン酸 (C<sub>18:1</sub>)、リノール酸 (C<sub>18:2</sub>) の如き高級脂肪酸が比較的多量に検出された。培養条件が嫌氣的になるに従って高級脂肪酸の量および種類は減少し、窒素培養ではパルミチン酸 (C<sub>16</sub>)、パルミトオレイン酸 (C<sub>16</sub>)、ミリスチン酸 (C<sub>14</sub>) が検出されるにとどまった。したがって、高級脂肪酸の合成には酸素分圧が深い関係を持つという考えが成立する。

## 結 論

好氣的ならびに嫌氣的に培養した *M. rouxianus* のガス代謝の型および脂質合成能と生産脂肪酸の種類をしらべた。*M. rouxianus* は好氣嫌氣両条件で培養したもの共、1より小さい endogenous  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  をしめした。ところがこれにグルコースを与えると好氣的に培養したものでも  $Q_{CO_2}/Q_{O_2}$  は1より大となった。従って *M. rouxianus* では脂肪の代謝が活発におこなわれているものと考えられる。*M. rouxianus* の細胞内に貯えられる脂質量は好氣的に培養したものでは特に多く、乾燥菌体の11%にも達した。細胞内に貯えられる脂質を構成する脂肪酸はラウリン酸 (C<sub>12</sub>)、ミリスチン酸 (C<sub>14</sub>)、パルミチン酸 (C<sub>16</sub>)、ステアリン酸 (C<sub>16</sub>)、オレイン酸 (C<sub>18:1</sub>)、リノール酸 (C<sub>18:2</sub>) 等である。好氣的に培養した菌体では高級脂肪酸が比較的が多量で、嫌氣的に培養した菌体では高級脂肪酸は少なかった。

文 献

- ANDREASEN, A. A., and T. J. B. STIER. 1953. *J. Cellular Comp. Physiol.* **41**: 23-36.  
1954, *Ibid.* **43**: 271-281.
- BARTNICKI-GARCIA, S., and W. J. NICKERSON. 1961. *J. Bacteriol.* **82**: 142-148.  
1962a. *Ibid.* **84**: 829-840.  
1962b. *Ibid.* **84**: 841-858.  
1962c. *Biochem. Biophys. Acta* **58**: 102-119.
- BARTNICKI-GARCIA, S. 1963. *Bacteriol. Reviews* **27**: 293-304.
- LÜERS, H., R. KUHLES, und H. FINK. 1929. *Biochemische Zeitschrift* **217**: 253-278.
- NICKERSON, W. J. 1949a. *J. Gen. Physiol.* **33**: 41-55.  
1949b. *Biochem. Biophys. Acta* **3**: 461-475.