

酵母による菌体外アミラーゼ生産*

赤木盛郎・河村龍二郎**
山田哲也***・中尾孝子

On the Production of Extracellular Amylase by Yeast

Morio AKAKI, Ryuziro KAWAMURA,** Tetsuya YAMADA*** and Takako NAKAO

緒 言

澱粉質原料を用いる各種食品工業廃水、とくに清酒醸造工場からの廃水中には、澱粉を主体とする有機物が多量に含有されている。また、これらの工場は一般に中小規模のものが多く、廃水の季節的変動が大きいので、負荷変動に強く澱粉質を特異的に除去でき、しかも安価な処理法が求められている。酵母には、薬剤耐性や pH の変動に強いなどの生理的特色を有するものがあり、菌体の SCP としての有効利用も期待されることから吉沢ら¹⁻⁵⁾により、酵母による清酒工場、澱粉工場からの廃水処理法が開発されている。吉沢らは樹木類から採取した酵母から多くの澱粉資化性酵母を得ており、これらは *Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp., *Endomycopsis* sp., *Debaryomyces* sp., *Candida* sp. など多くの属にわたっていることから、これらの酵母が広く自然界に存在していることが予想される。

著者らも保存菌株315株から数株の澱粉資化能のすぐれた酵母を得ているが、さらに実用化にむけて澱粉資化力にすぐれ、澱粉質を多量に含む廃水の処理により有効な酵母菌株を得ることを目指して、澱粉工場周辺から採取した土壌から澱粉質資化性酵母の分離、検索を試みた。また酵母起源のアミラーゼについては、菌体外グルコアミラーゼ生産菌として知られる *Endomycopsis fibuligera*,⁶⁻¹⁴⁾ *Saccharomyces diastaticus*,¹⁵⁻¹⁷⁾ さらに菌体内アミラーゼ生産菌として *Lipomyces* sp.,^{18,19)} *Schwanniomyces* sp.,²⁰⁾ *Candida* sp.,^{21,22)} などを除いては比較的その報告が少ない。本報告では、菌体外アミラーゼ生産菌の方が菌体内アミラーゼ生産菌より有利と考え、菌体外アミラーゼに着目し、その生産性の向上を検討した。

* 澱粉資化性酵母に関する研究

** 持田製薬株式会社

*** 三重大学

供試菌株および実験方法

1. 澱粉資化性酵母の分離検索と一次選択

吉沢ら¹⁻⁵⁾は樹木より分離した酵母から多数の澱粉資化性酵母を得ているが、著者らは分離源を澱粉工場のとくに澱粉質が多く存在していると考えられる土壌とし検索を行った。

1) 供試菌株

今回、澱粉工場周辺で採取した土壌試料65検体から分離した酵母および研究室の保存菌株315株から選択した酵母26株を供試菌とした。

土壌からの分離方法は、土壌試料を無菌水に懸濁させ、適当に希釈後、可溶性澱粉1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、酵母エキス0.01%、寒天2%、pH5.4の培地に懸濁させ、30℃、4～7日間平板培養を行い酵母を分離した。

2) 培地組成および培養方法

試験管(径1.8×18cm)に、可溶性澱粉1%、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、酵母エキス0.01%、pH5.4の培地6mlを分注し、滅菌後、供試菌の一白金耳量を接種し、30℃、4日間振とう培養を行い、生育(680nmにおけるOD)と培養後のpHを測定した。

3) UV変異株の誘起

Table 1に示した培地に寒天2%を加えた培地10mlを入れた滅菌シャーレに、供試菌を無菌水に 5×10^5 cells/mlとなるように懸濁させた懸濁液0.1mlを表面塗抹し、殺菌灯(15W)で照射距離15cmから紫外線照射を行い、生存率0.1～0.3%となるように、所定時間照射後、30℃で3～7日間培養し、生育のとくによいと思われる株を分離した。これにより得られた変異株を第一代UV変異株とした。

Table 1 Composition of basal Medium.

Soluble starch	2.0 (%)
Poly pepton	0.7
KH_2PO_4	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
Yeast extract	0.01
pH	5.5

2. 二次選択および選択株(赤色酵母J-5B)のアミラーゼ生産条件の検討

吉沢ら¹⁻⁵⁾が分離選択した澱粉資化性酵母のアミラーゼは、菌体外よりむしろ菌体内と膜に多く存在していることが報告されているが、廃水の負荷変動、とくに高負荷の廃水処理で満足しうる有機物の除去率をあげるためには、菌体外アミラーゼ生産能のすぐれる酵母の方がより

好結果をうることが期待されるため、1で選択された5株とその第一代UV変異株28株合計33株を供試菌株として、菌体外アミラーゼ生産について検討した。また得られた優良株について、さらにUV変異株を誘起し、培養条件の検討などにより菌体外アミラーゼ生産の向上をはかった。

1) 培地組成および培養方法

Table 1 に示した培地30ml を100ml 容三角フラスコに分注し、120℃、20分オートクレーブ処理により滅菌、冷却後、供試菌の白金耳量を接種し、30℃、4日間、160rpmの振とう培養を行った。培養後、遠心分離(4000rpm、15分間)して上澄を酵素液とした。

2) 菌体外アミラーゼ活性の測定

2%可溶性澱粉0.5ml、0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.25mlに、適度に希釈した酵素液0.25mlを加え、40℃、10分間反応させ、反応後DNS法²³⁾により生成還元糖を定量した。酵素力価は酵素液1mlが40℃、1分間に1 μ molのグリコース相当の還元力を生成したときを1unitとするinternational unitで表示した。

3) UV変異株の誘起

1-3)に述べた方法により、第一代UV変異株から誘起した変異株を得、これを第二代UV変異株とした。

4) 各種添加物、初発pHのアミラーゼ生産への影響

Table 1 に示した培地を基本培地として、フィチン0.1%、0.3%、0.5%、米糠0.1%、0.3%、0.5%をそれぞれ添加した培地を調製し、1)の方法と同様の培養(ただし培養日数は5日間とした)を行い、培養液中のアミラーゼ活性を測定した。

初発pHの影響は、Table 1の培地に米糠0.5%を添加した培地を用い、1N NaOHおよび1N HClで初発pHを調製後、1)の記載と同様に行った。

また培地を小麦ふすま1%、3%、5%および米糠0.5%をそれぞれ添加した培地(pH5.5)においても、1)の方法と同様に培養を行いアミラーゼの生産を検討した。

さらに小麦ふすま10gに水道水10mlを加え、シャーレに入れ120℃、20分間のオートクレーブ処理で滅菌後、あらかじめTable 1の培地30mlで30℃、3日間、160rpmの振とう培養を行って得た菌懸濁液(1×10^7 cells/ml)1mlを接種し、30℃、5日間固体培養を行った。培養終了後、0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)200mlに懸濁させ、よく攪拌後、培養物を遠心分離(10000rpm、20分間)で回収し、上澄のアミラーゼ活性を測定した。

実験結果ならびに考察

1. 澱粉資化性酵母の分離検索と一次選択

土壌試料65検体から72株の澱粉資化性酵母が得られ、それらの中には赤色酵母23株が含まれていた。

液体培養における生育度を比較検討した結果、OD 値0.8以上を示した5株を選択した。それらはいずれも澱粉工場周辺の土壌から分離した酵母で、すべて赤色酵母であった。

これら5株を親株としてUV変異株を誘起し、計28株のUV変異株を得た。

供試菌株の中には、採用した培養条件では菌糸を生成するものや、凝集する菌株もあり、ODによる生育度の測定は必ずしも適当とはいいがたいが、生育の良好な菌株ほど培養液のpHが低下する傾向があり、ODと培養後のpHとにより生育の良否を判定した。

以上の結果から、吉沢ら¹⁻⁵⁾およびこれまでに報告されたアミラーゼ生産菌⁶⁻²²⁾中には、赤色酵母の報告は見当らず、興味をもたれた。また、今回土壌中から澱粉資化性酵母が多数分離できたのは、これらの酵母が広く自然界に存在していると考えられた。

2. 二次選択および選択株(赤色酵母J-5B株)による菌体外アミラーゼ生産条件の検討

1) 酵母による菌体外アミラーゼ生産

供試菌株33株のうち、親株5株とその第一代UV変異株28株中すぐれたアミラーゼ生産を示した菌株5株、合計10株のアミラーゼ生産を検討した結果をTable 2に示した。

Table 2 Amylase Production by Yeast.

Yeast strains	Amylase activity (IU/ml medium)	Yeast strains	Amylase activity (IU/ml medium)
J	4.0	G	12.5
48	3.3	48-A	4.4
26-B	2.6	48-B	4.0
41-B	2.1	J-5	25.0
G-A	3.0	J-3B	10.3

Amylase activity measurement : culture broth was allowed to react under the condition and reducing saccharide produced was estimated by DNS method.

Measurement condition : 2.0% soluble starch 0.5 ml
0.1M acetate buffer (pH 5.0) 0.4 ml
culture broth 0.1 ml
incubated at 40°C for 10 min.

Cultural condition : yeast was cultivated at 30°C for 4 days on rotary shaker (160rpm).

すなわち、赤色酵母J株の第一代UV変異株J-5株が最高の25 IU/mlを生産した。

次に第一代UV変異株J-5株を親株としてさらにUV変異株を誘起し、157株の第二代UV株を得た。これらを供試菌株として同様にアミラーゼ生産を検討した結果、最高41 IU/mlを生産する酵母J-5B株を得ることができた。以後の実験は本菌株を使用した。

2) フィチン, 米糠の添加および初発 pH の影響

フィチン添加の影響については, 0.1~0.5%の添加では差はみられず, 未添加の場合と比較して, 41 IU/ml から52 IU/ml に向上した。米糠添加の影響については, 0.1%添加で57 IU/ml, 0.3%添加で77 IU/ml, 0.5%添加で80 IU/ml のアミラーゼ生産に特に有効であることが分った。フィチン0.1%, 米糠0.5%を添加した場合のアミラーゼ生産を Fig. 1 に示した。

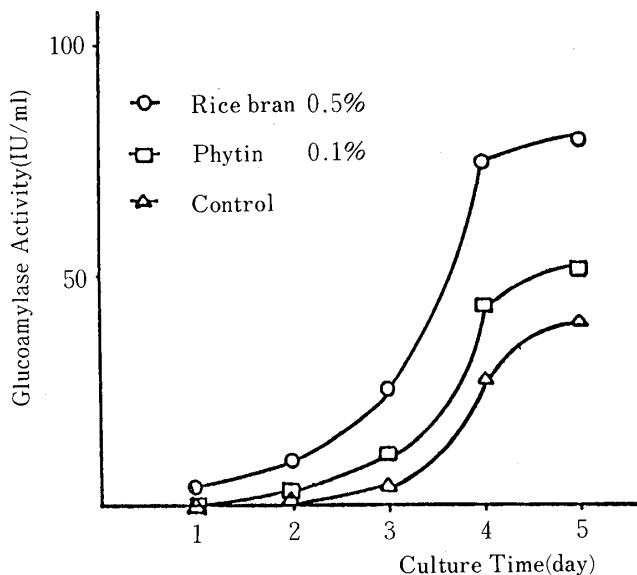


Fig. 1. Time Course of Glucoamylase Production by J-5B Strain.
Cultural condition: the yeast was cultivated at 28°C on rotary shaker (160rpm).

すなわち, 培養4~5日において最高のアミラーゼ生産を示した。

次に初発 pH 2.5~6.0の培地を調製し, アミラーゼ生産におよぼす影響を検討した。結果を Fig. 2 に示した。

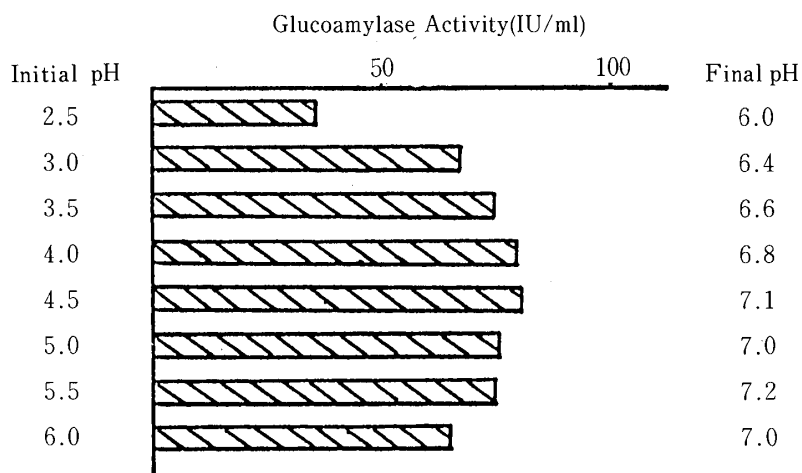


Fig. 2. Effect of Initial pH on Glucoamylase Production by J-5B Strain.
Cultural condition: the yeast was cultivated at 30°C for 5 days on rotary shaker (160rpm).
Culture medium: basal medium + rice bran 0.5%.

すなわち、初発 pH3.5~5.5がアミラーゼ生産に適していることが分った。

3) 小麦ふすま, 米糠培地での培養結果

小麦ふすまおよび米糠を培地とした結果を Fig. 3 に示した。

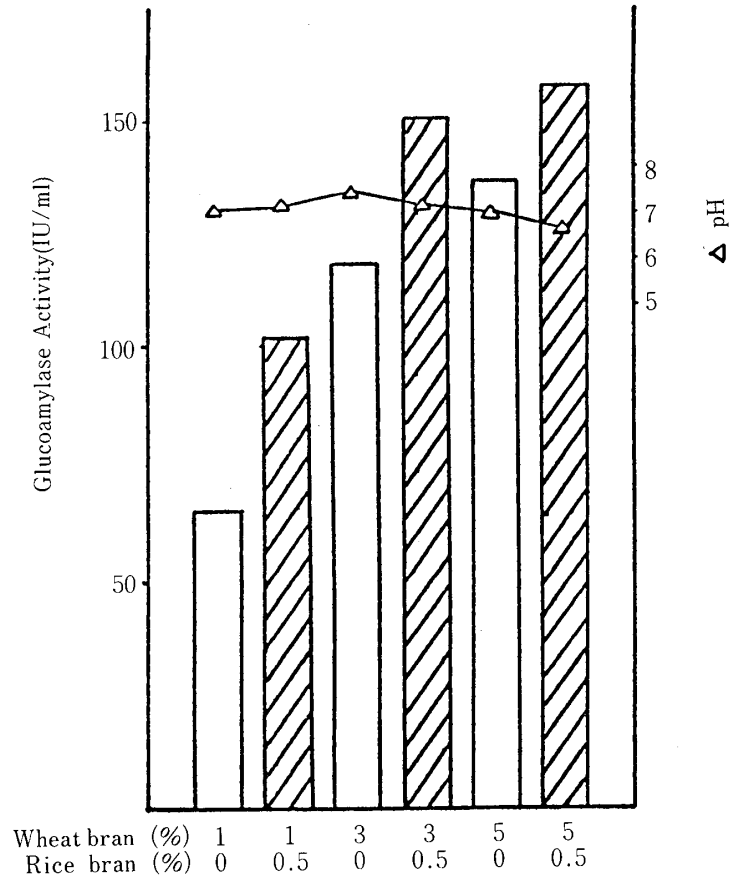


Fig. 3. Glucoamylase Production by J-5B Strain.

Cultural condition: the yeast was cultivated in 30ml of each medium at 30°C for 5 days on rotary shaker (160rpm).

その結果、小麦ふすま5%、米糠0.5%とした培地がもっともアミラーゼ生産が高く、最高154 IU/mlのアミラーゼを生産した。その際の経時的アミラーゼ生産を Fig. 4 に示した。

なお小麦ふすま濃度を5%以上にすると培地の流動性が悪くなり液体培養が困難となったので検討しなかった。

また、小麦ふすまによる固体培養の結果、小麦ふすま乾燥重量1g当り190 IUのアミラーゼ生産が認められ、本菌の固体培養によるアミラーゼ生産の可能性も示唆された。

以上考察すれば、服部ら⁶⁻⁸⁾は *Endomycopsis fibuligera* IFO 0111の菌体外アミラーゼ生産の向上を目的として、小麦ふすま、米糠、ごま粕などの添加効果を検討し、小麦ふすま、米糠の添加が有効であったと報告しているが、本研究においても、基本培地に0.5%の米糠を添加することにより、41 IU/ml から80 IU/ml とアミラーゼの生産を向上させることができた。また、小麦ふすまと米糠を組合せて培地をつくることにより、最高154 IU/mlのアミラーゼを生産す

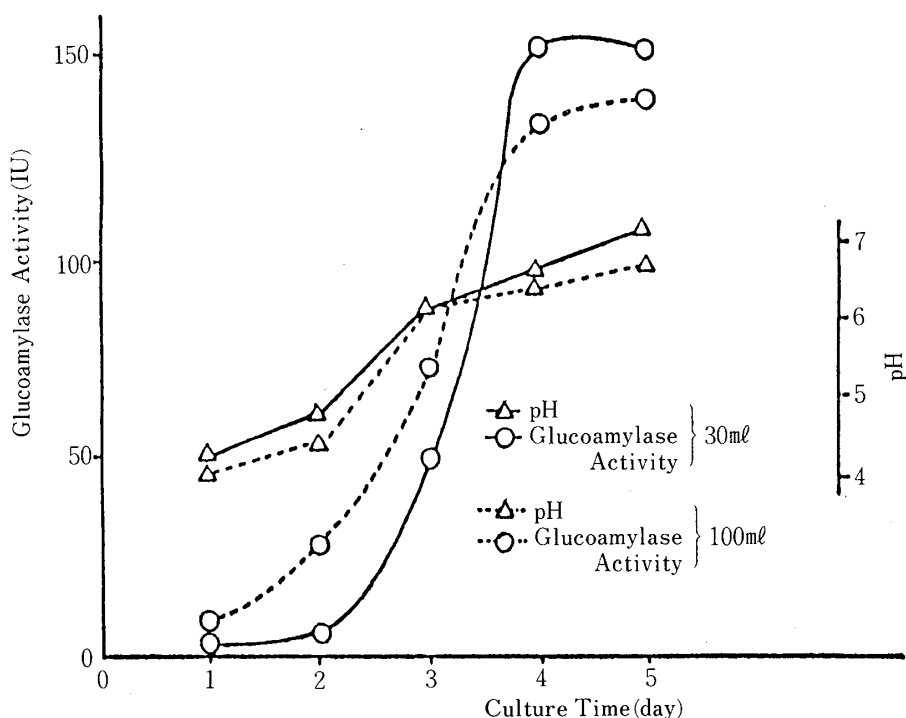


Fig. 4. Time Course of Glucoamylase Production by J-5B Strain.

Cultural condition: the yeast was cultivated in 30ml and 100ml medium, respectively, at 28°C on rotary shaker (160rpm).

Culture medium: wheat bran 5.0%
rice bran 0.5%

ることが可能となり、*E. fibuligera* IFO 0111,^{6~8)} *E. fibuligera* RI^{13,14)} と比較してもすぐれたアミラーゼ生産性を示した。基本培地において、米糠の添加により、2倍のアミラーゼ生産を示したのは、米糠中に含まれる生育因子の影響とも考えられるが、これについてはさらに検討を要する。また、基本培地の炭素源として可溶性澱粉のかわりにグルコースを用いると、アミラーゼがほとんど生産されないことから、本菌の生産するアミラーゼは誘導酵素と考えられた。また、本菌による菌体外アミラーゼ生産は、対数期中期から盛んになり、定常期中期の菌体を集菌、超音波処理により、菌体内アミラーゼを調べたところ、アミラーゼ活性はわずかしか測定されず、アミラーゼの大部分が菌体外に誘導されていると考えられた。

初発 pH の検討結果では、*Rhodotorula glutinis* No K-24株²⁴⁾が、初発 pH2.8~3 という限られた pH 域においてのみ強い酸性プロテアーゼ生産を示し、また *Trichosporon* sp. X-19株²⁵⁾が、培地によって初発 pH 3 付近でのみすぐれた菌体外蛋白質生産を示すという現象はみられず、比較的広い pH 域 (3.0~6.0) でアミラーゼを生産した。

以上、本菌は小麦ふすま、米糠など安価な培地で生育し、すぐれたアミラーゼ生産を示したことから、工業的アミラーゼ生産への可能性が示唆された。また、酵母のような厚い細胞壁を通しての高分子の菌体外生産の機構に興味もたれた。

要 約

自然界より澱粉資化性酵母の分離検索を行い、澱粉工場周辺の土壌より72株の酵母菌を得た。これらの中には23株の赤色酵母が含まれていた。

分離した赤色酵母から紫外線照射による変異株を誘起し、菌体外アミラーゼ生産の向上を検討したところ、野生株J株の第二代 UV 変異株 J-5B は、親株の10倍に相当する41 IU/ml のアミラーゼを菌体外に生産した。

さらに、培養条件を種々検討し、菌体外アミラーゼ生産の向上をはかったところ、米糠の添加が特に有効であることが分り、培地に小麦ふすまと米糠を組合せることにより、最高154 IU/ml まで菌体外アミラーゼ生産を向上させることができた。

文 献

- 1) 吉沢 淑, 百瀬洋夫, 有賀義裕: 醸協., 71, 873 (1976)
- 2) K. YOSHIZAWA: *J. Ferment. Technol.*, 56, 389 (1978)
- 3) 吉沢 淑: 発酵と工業., 35, 1013 (1977)
- 4) 吉沢 淑, 百瀬洋夫, 蓮尾徹夫: 醸酵工学, 58, 139 (1980)
- 5) 吉沢 淑: 農化, 55, 705 (1981)
- 6) Y. HATTORI: *Agric. Biol. Chem.*, 25, 737 (1961)
- 7) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 25, 895 (1961)
- 8) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 26, 316 (1962)
- 9) Y. FUKUI and S. NIKUNI: *Agric. Biol. Chem.*, 33, 884 (1969)
- 10) L. J. WICKERHAM: *J. Bact.*, 48, 413 (1944)
- 11) H. EBERTOVA: *Folia. Microbiol.*, 11, 14 (1966a)
- 12) H. EBERTOVA: *Folia. Microbiol.*, 11, 422 (1966b)
- 13) J. SUKHUMAVASI, K. KATO and T. HARADA: *J. Ferment. Technol.*, 53, 559 (1975)
- 14) K. KATO, K. KUSWANO, I. BANNO and T. HARADA: *J. Ferment. Technol.*, 54, 831 (1976)
- 15) R. H. HOPKINS and D. KULKA: *Arch. Biochem. Biophys.*, 69, 45 (1957)
- 16) 齊藤 清, 坂井拓夫: 昭和57年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, p.566
- 17) 齊藤 清, 坂井拓夫ら: 昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1983, p.351
- 18) G. J. MOLIN and P. GALZY: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1165 (1979)
- 19) I. S. MORITTA and N. UDEN: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 6, 241 (1979)
- 20) K. O. GYANG, G. MOULIN and P. GALZY: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 9, 129 (1980)
- 21) T. SAWAI: *J. Biochem. (Japan)*, 45, 49 (1958)
- 22) H. EBERTOVA: *Folia. Microbiol.*, 8, 833 (1963)
- 23) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 1973, p.19
- 24) 村尾沢夫, 鎌田 啓, 中瀬 索, 小倉セイ, 小田耕平: 農化, 46, 167 (1972)
- 25) M. AKAKI, Y. NAKASEKO and T. YAMADA: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 2391 (1978)