

Rhodosporidium sp. J-5B 株溶菌酵素生産菌の検索*

赤木盛郎・河村龍二郎**
山田哲也***・中尾孝子

Screening of Microbes that produce Yeast Cell (*Rhodosporidium* sp. J-5B) Lytic Enzyme

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

緒言

先に報告した^{1,2)}澱粉資化性酵母 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株の遺伝学的改良, 育種的手段としてプロトプラスト融合法を考えた。プロトプラスト融合は, プロトプラスト化, 融合, 再生の三段階にわかれるが, プロトプラスト化の際, 酵母の細胞壁溶解酵素としてよく用いられている酵素にザイモリエイスがある。しかし, ザイモリエイスは著者らの分離酵母 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株に対しては, 溶菌性をほとんど示さなかった。これは本菌が担子菌類に分類される酵母で, 子のう菌に分類される酵母と比較して, 細胞壁構造が異なるためと考えられる。そこで本菌のプロトプラストを得ることを目的として, 本菌を溶菌する酵素生産菌を自然界から検索した。

実験方法

1. アルカリ処理菌体の調製³⁾

Rhodosporidium sp. J-5B 株を YM 培地 (グルコース 1%, 麦芽エキス 0.3%, 酵母エキス 0.5%, ポリペプトン 0.7%) で 30℃, 160rpm, 5 日間の振とう培養を行い, 菌体を遠心分離 (4000rpm, 15 分間) により集め, 0.9% 食塩水で 3 回洗浄後, 2 倍容の 3% NaOH に懸濁し, 沸騰浴中で 3 時間処理した。冷却後, 遠心分離 (4000rpm, 15 分間) により処理菌体を集め上澄の NaOH を除き, 1 N HCl で中和後, 蒸留水で 5 回洗浄した。つぎに湿菌重量に対して 5 倍容のエタノー

* 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

ルで5回洗浄した後、室温乾燥した。乾燥後、粉碎し200メッシュの篩を通過した菌体をアルカリ処理菌体とした。

2. 自然界から溶菌酵素生産菌の分離

溶菌酵素生産菌の分離は Table 1 に示した培地に、適度に希釈した土壌懸濁液を加え、かく拌後シャーレ中で3～7日間の平面培養を行い、クリアゾーン法により分離した。分離菌はYM斜面培地で保存した。

Table 1. Composition of Medium.

NaOH-treated cells	0.1 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
KH ₂ PO ₄	0.02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
Yeast extract	0.001
Agar	2.0
pH	6.0

3. 溶菌酵素力の測定法

溶菌酵素力の測定法は主として田端⁴⁾および白石³⁾の方法に順じつぎの如く行った。前記アルカリ処理菌体1.5mgを0.5mlの0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)に懸濁し、これに適度に希釈した酵素液または酵素生産菌培養液2mlを加え、30℃、60分間往復振とうして反応させ、反応前後の濁度を660nmで測定し濁度減少率を求め、希釈前の原酵素液2mlが、10%の濁度減少を示した場合を1 unit とした。

$$\text{Lytic Effect (LE)} = \frac{(d_o - d_t) - (C_o - C_t)}{d_o - d_E} \times 100$$

ただし do: 反応液初発 OD

dt: 反応液60分後の OD

d_E: 菌体懸濁液の代わりに水を用いたときの OD

Co: 酵素液の代わりに水を加えたときの対照の初発 OD

Ct: Co の60分後の OD

なお、アルカリ処理菌体を基質とした場合 Co-Ct=0 となるためこれは無視した。d_E は供試菌や培養条件によっては無視できない場合があったほか、LE は50%以下となるように酵素液を希釈した。

4. 培養条件の検討

Table 2. Composition of Medium.

A-medium	
NaOH-treated cells	0.5 %
Polypeptone	0.1
KH ₂ PO ₄	0.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Yeast extract	0.01
pH	6.5
B-medium	
NaOH-treated cells	0.5 %
Asp.	0.1
K ₂ HPO ₄	0.05
pH	7.0
C-medium	
NaOH-treated cells	0.5 %
Polypeptone	0.1
Malt extract	0.1
pH	6.5

A, B, C 3種の培地 (Table 2) それぞれ30ml を100ml 容三角フラスコに分注し, 殺菌, 冷却後, 供試菌の一金耳を接種し, 30°C, 160rpm, 4日間の振とう培養を行った。培養後, 遠心分離 (4000rpm, 15分間) により菌体を回収し, 上澄の溶菌酵素活性を測定した。活性測定は24時間ごとに経時的に行った。また, 初発 pH の影響は 1 N HCl および 1 N NaOH により pH を調整した B 培地 30ml において同様に検討した。また, グルコースの影響については, B 培地 (pH6.0) 30ml にグルコース 0.05%, 0.1%, 0.3% およびアルカリ処理菌体をグルコースにかえ, 溶菌酵素生産に及ぼす影響を調べた。

5. 溶菌酵素の調製および性質

放線菌 39-B 株を供試菌として用いた。培地 (アルカリ処理菌体 0.5%, グルコース 0.05%, アスパラギン 0.1%, K₂HPO₄ 0.05%, pH6.0) 150ml を 500ml 容三角フラスコに分注し, 殺菌, 冷却後, 同じ培地で 2 日間前培養 (30°C, 160rpm の振とう培養) した培養液 2 ml を接種し, 28°C, 200rpm の振とう培養を行った。

培養後, 遠心分離 (5000rpm, 15分間) により菌体を回収し, 上澄に対し 80% 飽和の硫酸塩析を行った。つぎに沈澱物を遠心分離 (8000rpm, 15分間) により集め, 純水に溶解後, 一夜流水中で透析を行い, 不溶物を除去した後, 凍結乾燥し溶菌酵素標品を得た。

本酵素の至適 pH は, 0.1M McIlvaine 緩衝液 (pH 3 ~ 8) を用い, 0.5mg/ml の粗酵素液として, 前述の測定法により検討した。

各種酵母生細胞に対する溶菌性は保存菌株を供試菌として村尾ら⁵⁾の方法を参考として行った。50ml YPG 培地 (0.4%酵母エキス, 0.5%ポリペプトン, 2%グルコース, 0.5%KH₂PO₄, 0.2%MgSO₄·7H₂O) に30℃で静置培養を行い, 対数増殖期初期の菌体を集菌後, 純水で3回洗浄し, 0.1M酢酸緩衝液 (pH5.6) に660nmにおけるOD0.6~0.7となるように懸濁させた。ついで, 酵母懸濁液2.5mlに粗酵素液 (10mg/ml) 1mlを加え, 30℃, 3時間往復振とうしながら反応させ, 濁度減少率で溶菌力を求めた。

実験結果

1. 溶菌酵素生産菌の検索

クリアゾーン法により, 土壌サンプル82検体から溶菌酵素生産菌42株を分離した。つぎにA培地で菌体外に酵素生産の認められた6菌株について, B培地およびC培地でも同様に培養を行いその結果をTable 3に示した。

Table 3. Lytic Enzyme Production by Isolated Microbes.

Strain No.	A medium	B medium	C medium
	Lytic Enzyme (unit)	Lytic Enzyme (unit)	Lytic Enzyme (unit)
6	1.2	0.3	0.1
11	0.2	0.7	0.5
27	2.8	0.4	3.1
30	0.5	0.6	0.3
35-C	3.2	1.1	2.1
39-B	1.0	4.1	1.4

Cultural condition: each of microbes was cultivated in 30 ml of medium at 30°C for 4 days on rotary shaker (160 rpm).

供試菌中で放線菌と思われる39-B株とくにB培地で強い酵素生産が認められたので, 以後の実験にはこの菌株を用いた。

B培地を用いて初発 pH の影響を検討した。その結果を Fig. 1 に示した。

すなわち, 初発 pH 6 付近で溶菌酵素の生産が著しく向上した。

つぎに, B培地において, アルカリ処理菌体をグルコースにかえ培養したところ溶菌酵素の生産はみられず, 本菌の溶菌酵素がアルカリ処理菌体により誘導されることが判明した。

さらに, B培地にグルコース0.05%, 0.1%, 0.3%を添加し, 初発 pH6.0とした培地を用いて検討したところ, グルコース0.05%添加では溶菌酵素生産が6単位から9.5単位に向上したが, グルコース0.3%の添加では顕著に阻害された。グルコース0.05%添加の際の経時的溶菌酵素生産の検討結果を Fig. 2 に示した。

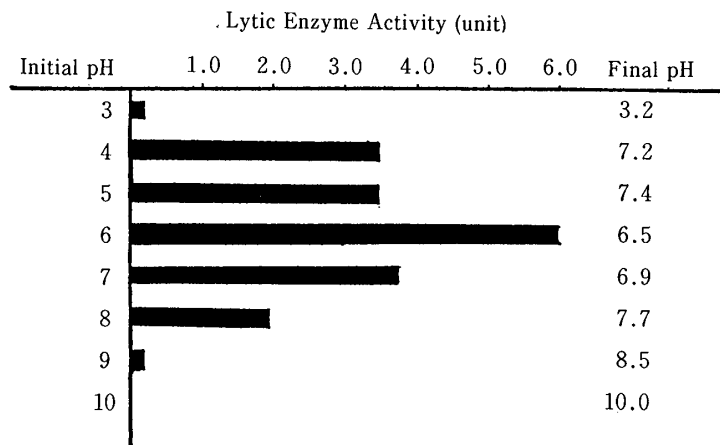


Fig. 1. Effect of Initial pH on the Production of Lytic Enzyme.

Cultural condition: 39-B strain was cultivated in 30 ml of medium at 30°C for 4 days on rotary shaker (160 rpm).
Culture medium: B medium.

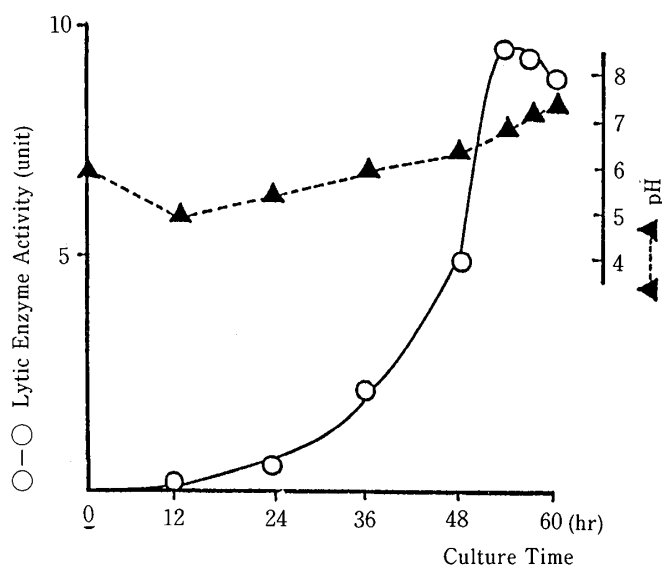


Fig. 2. Time Course of Lytic Enzyme Production.

Cultural condition: 39-B strain was cultivated in 30 ml of medium at 30°C on rotary shaker (160 rpm).
Culture medium: B medium + 0.05% glucose (pH 6.0).

2. 溶菌酵素の性質

本菌の溶菌酵素の至適 pH を検討した結果を Fig. 3 に示した。

その結果至適 pH 域は pH 5 ~ 6 の範囲にあった。

各種酵母生細胞に対する溶菌力を検討した結果を Table 4 に示した。

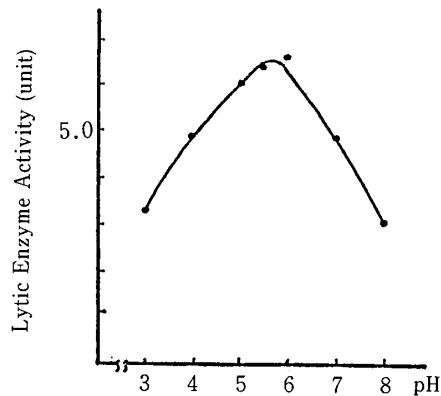


Fig. 3. Effect of pH on Lytic Enzyme.

Lytic enzyme was estimated under the standard assay condition at various pH. 0.1M Mcllvaine buffer for pH 3-8.

Table 4. Degradation of Various Yeast Living Cells with Lytic Enzyme.

Yeast strain	Degree of lysis (% reduction in O. D)	Yeast strain	Degree of lysis (% reduction in O. D)
<i>Rhodosp. sp. J-5B</i>	68	<i>Hansenula anomala</i>	48
<i>Candida utilis</i>	8	<i>Sacch. diastaticus</i>	38
<i>Mycotorula japonica</i>	0	<i>Rhodotorula sp. z-13</i>	0

Composition of reaction mixture: lytic enzyme solution (10mg/ml) 1.0ml.
yeast suspension (pH5.6) 2.5ml.

The reaction mixture was incubated at 30°C for 3 hr with shaking.

その結果、*Hansenula anomala* および *Saccharomyces diastaticus* には溶菌力を示したが、*Candida utilis* には弱く、*Rhodotorula*, *Mycotorula* には溶菌力を示さなかった。

考 察

Rhodospiridium sp. J-5B 株を溶菌する酵素生産菌株を土壌を検体として広く検索した結果、細菌、放線菌、糸状菌に細胞壁溶解能を有する菌が分布していた。その中放線菌と思われる一菌株にとくに強い溶菌酵素生産が認められた。

従来の酵母細胞壁溶解酵素の多くは、*Saccharomyces sp.* を対象としたものが多く、赤色酵母については村尾ら⁵⁾の報告した *Penicillium lilacinum* による *Rhodotorula glutinis* の細胞壁溶解酵素の生産、および白石ら³⁾の報告した細菌による *Sp. ruberrimu* の細胞壁溶解酵素の生産などが報告されている。

Saccharomyces sp. を対象とした酵素の多くは、その至適 pH が中性から弱アルカリ性にあるのに対し、村尾ら⁵⁾、馬田ら⁶⁾の報告や、本研究の場合、その至適 pH が酸性側にあり、酵母の生細胞に対しても強い溶菌能を示すことから、酵母の汚染によって商品価値を著しく低下させ

る酸性食品の保存剤や、酸性下において酵母の溶解処理が必要な面での利用も期待されうるものと考えられる。

各種酵母の生細胞に対する溶菌力においては、*Hansenula anomala*, *Saccharomyces diastaticus* に対してはすぐれた溶菌力を示したが、*Candida utilis* に対しては弱く、*Mycotorula japonica*, *Rhodotorula* sp. Z-13 に対しては溶菌力を示さなかった。本研究で用いた *Rhodosporidium* sp. J-5B が、*Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp. などを溶菌するザイモリエイスでは溶菌されず、本実験で得られた 39-5B 株の生産する *Rhodosporidium* sp. J-5B 株溶菌酵素が、ザイモリエイス同様 *Hansenula anomala*, *Saccharomyces diastaticus* を溶菌することから、本酵素中にはザイモリエイスと同じ酵素が存在し、かつ *Rhodosporidium* sp. J-5B 株を溶菌するために、ザイモリエイス中には存在しないか微量である他の因子を多く含有していることが考えられた。

ザイモリエイスの主成分が β -1, 3 glucanase, protease, mannanase などであることから、39-5B 株の生産する酵素中には、これらの他に chitinase, β -1, 6 glucanase などの存在が予想された。

要 約

澱粉資化性酵母 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株の遺伝学的改良、育種的手段としてプロトプラスト融合法を考え、本菌を溶菌する溶菌酵素生産菌の検索を試みた結果、放線菌の一菌株にすぐれた溶菌酵素生産が認められた。本酵素は、*Hansenula anomala*, *Saccharomyces diastaticus* に対しても溶菌力を示した。

文 献

- 1) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 鈴鹿短期大学紀要, **10**, 1 (1990)
- 2) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 鈴鹿短期大学紀要, **11**, (1991)
- 3) 白石淳, 藤井久雄: 農化, **52**, 553 (1978)
- 4) 田端司郎, 照井堯造: 醸酵工学, **40**, 366 (1962)
- 5) S. Murao, R. Yamamoto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 23 (1976)
- 6) 馬田三夫, 平緒一暁, 木村義夫, 野田国彦: 農化, **44**, 393 (1970)