排水処理用凝集性 *Hansenula anomala* J224 の性質

佐藤俊一・山本奈美*・下飯 仁・斎藤和夫・蓼沼 誠

(国税庁醸造試験所, *大阪国税局鑑定官室)

昭和 61 年 5 月 16 日 受理

Characteristics of Flocculent *Hansenula anomala* J244 for Waste Water Treatment

Utilization of Wild Yeasts (Part VI)

Shunichi SATO, Nami YAMAMOTO, Hitoshi SHIMOI, Kazuo SAITO
and Makoto TADENUMA

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo 114)

The flocculation of *Hansenula anomala* J224 which was isolated for waste water treatment from sake making, was not inhibited by EDTA and sugars, and it did not require Ca^{2+} ion. These characteristics were different from that of brewer's yeast.

Deflocculation by heat treatment above 80°C and treatment with pronase E, SH compounds, denaturants for proteins and detergents suggests that the flocculation of *Hansenula anomala* J224 will be depend on proteinous compound on the surface of the yeast cell.

Key words: 凝集性酵母, *Hansenula anomala*, 排水

緒 言

前報¹⁾において、清酒工場の沈殿槽から分離した *Hansenula anomala* J224 株は凝集性を有し、洗米排水や清酒中の有機物の資化能も強いので、現在実際の排水処理に使用されている酵母よりも排水処理用酵母として優れていること、また、その凝集は age、培地 pH 及び培養温度にほとんど影響されず、培地中のグルコース濃度が高くなる (10%) と阻害されることを報告した。

本報においては、*H. anomala* J224 の resting cell を用いて各種処理を行い、凝集に対する影響を調べた結果、本菌の凝集に細胞表層のタンパク質が関与しているものと推察されたので報告する。

実 験 方 法

1. 酵母懸濁液

H. anomala J224 を YM 培地²⁾で 30°C 2 日間振とう培養後、3,000 rpm, 10 分間遠沈し、殺菌水で 2 回洗浄後、殺菌水に懸濁した。その他の酵母についても同様に懸濁液を調製した。なお、特に断わらない限り使用野生酵母の利用に関する研究 (第 6 報)

菌株は J224 株を用いた。

2. 非凝集性変異株の取得

H. anomala J224 を YM 培地²⁾で L 字管中で 30°C 2 日間振とう培養し、1 時間静置後その上澄部を白金耳新しい培地に植継ぎ培養を続けた。その操作を 10 回以上繰返した後に平板培養により単一コロニーとし、その中で凝集性を示さない菌株を選択し、J224-1 株とした。この菌株の菌学的性質は凝集性以外は全て親株の J224 株¹⁾に一致した。

3. 凝集率及び酵母濃度

前報¹⁾と同様に次式により凝集率 (Flocculation Rate, 以下「FR」と略す。)を求めた。

$$\text{FR} = \frac{\text{OD}(\text{T}) - \text{OD}(\text{S})}{\text{OD}(\text{T})}$$

ここで、

OD(T): 前報¹⁾の条件と同様にしてプロナーゼ処理後の 660 nm, 10 mm セルによる吸光度を示し、酵母濃度も本条件で求めた。

OD(S): 前報¹⁾と同様にして 300 rpm, 5 分間遠沈後の上澄の 660 nm, 10 mm セルによる吸光度を示す。

4. 各種処理

各種処理は特に断わらない限り 0.01 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で 1 時間行い、処理後の酵母濃度は OD(T) $\pm$ 1 とした。

5. OD 比

各種酵素剤による処理効果は次式により OD 比として求めた。

$$OD = \frac{OD(E)}{OD(B)}$$

ここで、

OD(E)：酵母を酵素処理後、蒸留水で 2 回洗浄し、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、660 nm, 10 mm セルにより測定した吸光度を示す。

OD(B)：酵素を含まない酵素処理用緩衝液で酵母を処理後、OD(E) と同様な操作を行い測定した吸光度を示す。

OD 比 < 1 の場合凝集促進を、OD 比 > 1 の場合、凝集の分散を示す。

6. 疎水度

Iimura らの方法³⁾により測定した。すなわち、疎水度 (H. D. %) を次式により求めた。

$$H. D. = 100(I - R/I)$$

ここで、

I：0.01 M 酢酸緩衝液中に懸濁した酵母による OD を示す。

R：酵母懸濁液と等量のベンゼンと振とう後の水層の OD を示す。

実験結果

1. 酵母濃度

酵母濃度と凝集率の関係を第 1 図に示す。酵母濃度が高いほど高い凝集率を示した。

2. 処理温度

30～100℃ 10 分間処理後の凝集率を測定した結果、第 2 図に示すとおり、50℃ まではほとんど凝集率は変わらないが、80℃ 以上の温度で処理することによりフロクの分散が認められた。なお、ビール酵母では研究者により温度処理の効果が異なっている^{4,5)}。

3. キレート剤

培地に EDTA を添加した場合¹⁾と同様に 2～50 mM の EDTA の共存により凝集阻害は認められず、むしろ凝集促進の効果が認められた。なお、ビール酵母では凝集阻害が起ると報告されている⁴⁾。

4. 塩類

ビール酵母ではその凝集に Ca^{2+} を要求すると報告さ

第 1 図 酵母濃度と凝集

第 2 図 処理温度と凝集

第 3 図 $CaCl_2$ 濃度と凝集

れている⁶⁾。そこで、 $CaCl_2$ の凝集に対する効果を調べた。その結果、第 3 図に示すように $CaCl_2$ の濃度が高くなるにつれて凝集率の低下が認められた。この傾向は NaCl, KCl, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ についても認められ、その効果は 2 価の金属塩の方が一価の金属塩よりも大であり、共存する塩類のイオン強度に影響されるものと考えられた。

5. 糖類

ビール酵母の凝集はグルコースやマンノース等の糖類で阻害されることが知られている⁷⁾。そこで、10% の糖を加えた後 15 分間放置後の凝集率を調べた。その結果、第 1 表に示すように D-リボース等に凝集促進効果が認められたのに対し、イノシトール及び塩酸グルコサミンに阻害効果が認められた。特に D-リボースは 0.1% の低濃度でも効果が認められたが、デオキシリボースでは効果が全く認められなかった。また、イノシン酸には阻害 (FR 0.74) が認められ、その他の糖及び糖アルコールは凝集に対して何ら影響を与えなかった。

第1表 糖類と凝集

糖類 (10%)	FR	糖類 (10%)	FR
対 照	0.88	D-Arabinose	0.91
D-Fructose	0.91	Lactose	0.95
D-Mannose	0.93	Inositol	0.83
D-Galactose	0.91	D-Glucosamine-HCl	0.74
D-Ribose	0.96		

凝集に無関係の糖類：

D-Glucose, L-Sorbose, D-Xylose, Deoxyribose, D-Rhamnose, Sucrose, α -Methyl-D-mannoside, D-Sorbitol, Ribitol, N-Acetylglucosamine

6. 有機酸及びアミノ酸

ビール酵母では EDTA と同様キレート力が比較的強いクエン酸等に凝集阻害が報告されている⁷⁾が、10~100 mM の有機酸又は 2% のアミノ酸の共存ではほとんど凝防率に変化がなかった。

7. 酸及びアルカリ処理

酵母菌体を 1 N HCl 及び 0.5 N NaOH でそれぞれ 30°C 1 時間処理後、菌体を蒸留水で洗浄し、0.01 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) に懸濁し、凝集率を測定した結果、対照の FR が 0.89 であったのに対し、HCl 処理菌は 0.63, NaOH 処理菌は 0.84 となり酸及びアルカリ処理により分散されることがわかった。ビール酵母についても同様な傾向が認められている⁵⁾。

8. SH 化合物処理

2-メルカプトエタノール⁵⁾やジチオスレイトール⁸⁾処理はビール酵母の凝集を著しく分散させることが知られている。そこで、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 10 mM の 2-メルカプトエタノール及びジチオスレイトールで 24°C 30 分間酵母菌体を処理し、凝集率を測定した。その結果、対照の FR が 0.79 であったのに対し、処理菌体の FR は共に 0.56 であった。

9. 溶媒処理

50~90% エタノール処理によりほとんど凝集率は変化せず、クロロホルム・メタノール (1:1) 処理により、対照の菌体の FR が 0.94 であったのに対し、溶媒処理菌体の FR は 0.85 に減少した。

10. 界面活性剤及びタンパク変性剤処理

ビール酵母の凝集は界面活性剤やタンパク変性剤処理により影響を受けると報告されている^{6,8)}。そこで、各種

第2表 界面活性剤及びタンパク変性剤処理と凝集

薬 剤	濃 度	FR
対 照		0.89
TritonX-100	1 %	0.77
Tween 20	1 %	0.80
Tween 60	1 %	0.77
Tween 80	1 %	0.73
SDS ^a	20mM	0.52
Deoxycholate	1 %	0.66
CTAB ^b	2mM	0.39
Urea	5M	0.70
Guanidine-HCl	2.5M	0.46

a Sodium dodecyl sulfate

b Cetyltrimethylammonium bromide

界面活性剤は 24°C で、タンパク変性剤は 30°C でそれぞれ 30 分処理した後水洗を 2 回行い、0.01 M 酢酸緩衝液に再懸濁して凝集を調べた。その結果、第 2 表に示すとおり、いずれも分散効果を示したが、特に SDS や CTAB 等のイオン系界面活性剤及び塩酸グアニジン処理の効果が大きであった。

11. 酵素剤処理

ビール酵母の凝集性はプロテアーゼ系の酵素剤処理により低下することが知られている^{6,8)}。そこで第 3 表に示す酵素剤と処理条件により酵母を処理し、OD 比を求めた。ビール酵母で効果のあったトリプシン^{6,8)}では効果がなく、プロナーゼ E やパパイン処理により分散した。これらはビール酵母でも同様な効果を示すと報告されている^{6,8)}。リパーゼはビール酵母では何の影響も示さない⁶⁾が、本菌に対しては凝集促進効果を示した。

12. 疎水度と凝集

ビール酵母の凝集⁶⁾やワイン醸造中に汚染菌として出現する産膜酵母⁸⁾は疎水度が大きであると報告されている。そこで、*H. anomala* J 224, その非凝集性変異株 J 244-1 及び実際の排水処理に使用されている *H. anomala* J 45-1 の疎水度を調べた結果、第 4 表に示すとおり、凝集性を示す J 224 株は非凝集性の J 224-1 及び J 45-1 株に比べ疎水度が著しく高いことが明らかとなった。

次に *H. anomala* J 224 について、前述の実験で凝集性に著しく変化を与える処理を行った後にそれぞれ疎水度を調べた結果、第 5 表に示すとおり、必ずしも凝集性

第3表 酵素剤処理と凝集

酵 素 剤	濃 度	処 理 条 件	OD 比 ^a
Trypsin (Sigma 社 牛スイ臓)	1mg/10ml	1/20M トリス・塩酸 (pH 8.0), 30°C, 1hr	0.74
Papain (Sigma 社)	1mg/10ml	0.02M トリス・塩酸 (pH 7.6), 30°C, 30 min	1.56
Pronase E (Sigma 社)	2.5mg/10ml	0.02M トリス・塩酸 (pH 7.6), 35°C, 1hr	5.22
Lipase (天野製薬 AP-6)	4mg/10ml	1/15M リン酸 (pH 5.8), 30°C, 3hr	0.18

a OD⁶⁶⁰ (酵素処理)/OD⁶⁶⁰ (酵素を除き同一条件で処理)

第4表 酵母の凝集と疎水度

酵 母	凝 集 性	疎水度(H. D. %)
<i>H. anomala</i> J 45-1	—	62
<i>H. anomala</i> J 224	++	91
<i>H. anomala</i> J 224-1 ^a	—	30

a *H. anomala* J 224 より得た非凝集性変異株

第5表 各種処理と疎水度

処 理 ^a	凝集に対する効果 ^b	疎水度(H. D. %)
対 照		91
0.5 N NaOH	—	83
1N HCl	—	90
CTAB	—	96
Guanidine·HCl	—	94
Trypsin	±	82
Papain	—	53
Pronase E	—	43
Lipase	+	95

a 第2表及び第3表と同一方法

b + : 凝集促進 — : 分散

の変化が一致しなかったが、分散力の強いプロナーゼE処理により、第4表に示したJ224株の非凝集性変異株であるJ224-1株に近い疎水度を示した。

考 察

ビール酵母(*Saccharomyces* 属)の凝集と*H. anomala* J224の凝集とは類似した点もあるが、J224株の凝集はCa²⁺を要求せず、EDTAにより阻害されないこと、ageによらず高い凝集性を示すこと、中性の糖では阻害されず、D-リボースにより促進されること、トリプシン処理では分散されず、リパーゼ処理では促進されること等ビール酵母の凝集とは異なる点が多い。

J224株の凝集はプロナーゼEにより著しく低下すること、80℃以上の温度処理によっても分散すること、SH化合物、タンパク変性剤及び界面活性剤処理によっても分散することから、酵母細胞表層のタンパク質が酵

母どうしの凝集に関与しているものと推定される。

また、凝集性と疎水度の関係も想定され、更に高濃度の塩類による凝集阻害等から、酵母細胞間の凝集のための引力として疎水結合やイオン結合が関与していることも推察される。

要 約

清酒工場の排水処理用酵母として分離した凝集性の*Hansenula anomala* J224の凝集はEDTAや糖類により阻害されず、その凝集にCa²⁺イオンも要求しなかった。これらの性質はビール酵母の凝集と異なる性質である。

80℃以上の加熱処理並びにプロナーゼE、タンパク変性剤及び界面活性剤処理による凝集の分散効果から本菌の凝集は酵母細胞表層のタンパク質に起因しているものと推定される。

なお、本研究の一部は環境庁国立公害防止等研究費によって行われた。

文 献

- 1) 佐藤俊一、前谷龍夫、山本奈美、蓮尾徹夫、斎藤和夫、蓼沼 誠、吉沢 淑：醸協，81 (9)，621 (1986)
- 2) 飯塚 廣、後藤昭二：酵母の分類同定法，第3版，138頁，東京大学出版会(1980)
- 3) Y. IIMURA, S. HARA and K. OTSUKA: *Agric. Biol. Chem.*, **44** 1223 (1980)
- 4) K. ESSER and Y. KUESS: *Process Biochemistry*, December, p. 21 (1983)
- 5) 鎌田耕造、村田容常：農化，58 991 (1984)
- 6) K. KAMADA and M. MURATA: *Agric. Biol. Chem.*, **48** 2423 (1984)
- 7) A. A. EDDY and M. A. D. PHIL: *J. Inst. Brew.*, **61** 313 (1955)
- 8) N. P. LIPKE and C. HULL-PILLSBURY: *J. Bacteriol.*, **159** 797 (1984)