耐塩性酵母の微細構造

東 和 男・山 本 泰・好 井 久 雄

(東京農業大学 醸造学科)

昭和 60 年 12 月 16 日受理

The fine structures of Salt-tolerant yeast

Kazuo HIGASHI, Yasushi YAMAMOTO, and Hisao YOSHII

(Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

Salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, was observed with a transmission electron microscope, and the following results were obtained.

(1) Salt-tolerant yeast cultivated in media with and without sodium chloride, which was fixed with a 2% potassium permanganate solution for 24 hours, was slightly over-fixed, while salt-sensitive yeast, *Saccharomyces sake*, cultivated under the same condition was completely over-fixed. Protoplasts of both types of yeast were fixed with a 2% osmium tetroxide solution. The above results suggested that the cell walls of salt-tolerant yeast acted as the barrier to protect cells from the permeation of potassium permanganate, and that they might act as the barrier to protect cells from the permeation of sodium chloride.

(2) The cell walls of salt-sensitive yeast cultivated in media containing sodium chloride tended to be thinner than that of cultivated in media without sodium chloride. But the cell walls of salt-tolerant yeast cultivated in both conditions were the same in thickness.

(3) The organelle formation of both types of yeast was not affected with sodium chloride, except for mitochondria of salt-tolerant yeast developed well in media without sodium chloride.

Key words : 耐塩性酵母, 細胞壁, 電子顕微鏡, 微細構造

緒 言

味噌及び醤油諸味の熟成に関与する耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の生理的特性については大西¹⁻³⁾の詳細な研究がある。酵母の耐塩性機構の一つとして、細胞壁が食塩の細胞内への透過の防壁となっていることも考えられる。著者ら⁴⁾は耐塩性酵母の細胞壁の化学組成を検討し、含塩下の培養で細胞壁のマナン・キチン含量は減少するが、蛋白質含量は増加することを認め、細胞壁の多糖類と蛋白質が耐塩性に関連することを推定した。本報では耐塩性酵母の固定液透過性を調べ、更に酵母の微細構造に及ぼす食塩の影響を検討することを目的として電子顕微鏡による観察を行った。

実 験 方 法

1. 供試菌株 耐塩性酵母として *Zygosaccharomyces rouxii* B-1 (当研究室保存株), 対照酵母として *Sac-*

charomyces sake 協会 7 号を用いた。

2. 培養 前報⁴⁾と同様の培地を用いた。培地は無塩及び含塩(対照酵母 10%, 耐塩性酵母 18%)とし、*Zygosacch. rouxii* については無塩 16 時間・含塩 48 時間、*Sacch. sake* については無塩 10 時間・含塩 48 時間、30°C で静置培養を行った。

3. 電子顕微鏡試料の作製と観察 培養菌体を集菌し 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後、2% グルタルアルデヒドで 2 時間の前固定を行い、洗浄後、1, 2% 過マンガン酸カリウムで 24 時間の後固定を行い、洗浄後、1.5% 酢酸ウランで一夜染色し、アセトン系列 (30, 50, 70, 80, 90, 95, 99.8, 100% アセトン) で脱水し、メサクリレート樹脂に包埋した。重合ブロックを同一条件下でガラスナイフにより切削後、切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、続いてカーボン蒸着を行った後、透過型電子顕微鏡 (日本電子製 100-B) で観察した。なお中央で切削された 30 ㏄の細胞 (核と液胞が中

央に位置するもの)の細胞壁の厚さを測定した。

プロトプラストの観察については Zymolyase 20 T ((株)生化学工業)で洗浄菌体の細胞壁を溶解後, 2% グルタルアルデヒドで2時間の前固定を行い, 洗浄後, 過マンガン酸カリウムに比べ固定能の弱い四酸化オスミウムで2時間の後固定を行い, 以後は上述と同様に処理, 観察した。

結果及び考察

1% または 2% 過マンガン酸カリウムで固定した無塩及び含塩下培養の *Zygosacch. rouxii* を, Fig. 1, 2 に示

した。無塩及び含塩下での培養細胞はともに 1% 過マンガン酸カリウムで適度に固定されたが (Fig. 1 a, 2 a), 2% の条件では細胞壁の電子密度が高まり黒く染色されてやや過固定となったほか, 切削時のアーティファクトにより細胞壁が若干破損された (Fig. 1 b, 2 b)。

1% または 2% 過マンガン酸カリウムで固定した無塩及び含塩下培養の *Sacch. sake* を, Fig. 3, 4 に示した。無塩培養の細胞は 1% 過マンガン酸カリウムで過固定となり切削時のアーティファクトにより細胞壁が破損され (Fig. 3 a), 2% の条件では更に過固定となり細胞壁が破損された (Fig. 3 b)。含塩下培養の細胞は 1% 過マ

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

ンガン酸カリウムで適度に固定されたが (Fig. 4a), 2% の条件では細胞壁の電子密度が高まり黒く染色されて過固定となった (Fig. 4b)。以上のことは、含塩下培養の *Sacch. sake* の細胞壁は固定液透過を抑制することを示している。

2% 過マンガン酸カリウム固定で対照酵母は含塩・無塩下培養ともに著しく過固定の状態になったが、耐塩性酵母では僅かな過固定にとどまった。更に詳細な固定条件の検討も必要と考えられるが、上述のことは耐塩性酵母の細胞壁は対照酵母に比べ過マンガン酸カリウム固定液の細胞内への透過に対してより強い防壁となっていることを示している。

細胞壁が過マンガン酸カリウム固定液の防壁であることを確認するため、Zymolyase で細胞壁を溶解して得られたプロトプラストへの 2% 四酸化オスリウム固定液の透過の程度を観察した。含塩下培養した *Zygosacch. rouxii*, 無塩培養した *Sacch. sake* のプロトプラストを Fig. 5 に示した。対照酵母のプロトプラストは四酸化オスミウムで固定され (Fig. 5b), また耐塩性酵母のプロトプラストも四酸化オスミウムで適切に固定され細胞小器官が観察された (Fig. 5a)。このように耐塩性酵母,

対照酵母のプロトプラストは固定能の弱い四酸化オスミウムによって共に適切に固定されるにもかかわらず、上述のように固定能の極めて強力な 2% 過マンガン酸カリウムによっても耐塩性酵母の whole cell はやや過固定となったのは、その細胞壁が固定液の細胞内への透過の防壁となっているためとも考えられる。過マンガン酸カリウムと食塩の細胞内への透過性を同様に論じることができないが、上記の結果は細胞壁が食塩の細胞内への透過に対する防壁となっていることを示唆している。

細胞壁の厚さは、*Sacch. sake* においては無塩培養で $0.14 \mu\text{m}$ であるのに対し、含塩下培養で $0.10 \mu\text{m}$ と薄くなったが、*Zygosacch. rouxii* においては無塩及び含塩下培養ともに $0.12 \mu\text{m}$ であった。

対照酵母では無塩及び含塩下培養のいずれにおいても核・小胞体・ミトコンドリア・液胞等の細胞質構造に差異は無く (Fig. 3, 4), 食塩は細胞質構造に影響を及ぼさないことが観察された。耐塩性酵母では無塩培養でミトコンドリアが良好に発達したほかは、無塩及び含塩下培養の細胞質構造に差異は無く (Fig. 1, 2), 食塩はミトコンドリア以外の細胞質構造に影響を及ぼさないことが観察された。

Fig. 5

要 約

電子顕微鏡により耐塩性酵母 *Zygosacch. rouxii* の微細構造を観察し、次の結果を得た。

1) 2% 過マンガン酸カリウムで 24 時間固定した無塩及び含塩下培養の対照酵母 *Sacch. sake* は完全に過固定になったが、同固定条件では耐塩性酵母はやや過固定にとどまった。一方、両酵母のプロトプラストは過マンガン酸カリウムより固定能の弱い 2% 四酸化オスミウムによって適切に固定された。上記のことは、耐塩性酵母の細胞壁が細胞内への固定液の透過を抑制していることを示しており、細胞壁は食塩の細胞内への透過に対する防壁となることが推定される。

2) 細胞壁の厚さは、対照酵母では含塩下培養で薄くなる傾向が認められたが、耐塩性酵母では無塩と含塩下培養の間に差異が認められなかった。

3) 耐塩性酵母において無塩培養でミトコンドリアが良好に発達したほかは、耐塩性酵母、対照酵母のいずれにおいても食塩は細胞質構造に影響を及ぼさないことが観察された。

文 献

- 1) ONISHI H.: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 23, 332 (1959)
- 2) ONISHI, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 27, 543 (1963)
- 3) 大西 博：醸協誌, 25, 495 (1967)
- 4) 東 和男, 山本 泰, 好井 久雄：日食工誌, 31 225 (1984)