Zygosaccharomyces rouxii の酵母細胞壁

溶解酵素に対する感受性

富 田 実・岩 田 深 也

(徳島県工業試験場)

平成元年1月30日受理

Susceptibility of Viable Cells of *Zygosaccharomyces rouxii* to Yeast Lytic Enzyme

Minoru TOMITA and Shinya IWATA

(Tokushima Prefectural Institute of Industrial Technology., 2-6,
Kitamaegawa-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770)

Cells of *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 52698 grown in media containing 1~3 M sodium chloride were effectively lysed by treatment with Zymolyase (a yeast lytic enzyme, Kirin Beer Co. Ltd.), in contrast to cells grown without salt, which were scarcely lysed by the treatment. The former cells did not aggregate during incubation with the enzyme, whereas the latter cells, especially harvested at logarithmic phase, markedly aggregated during the incubation. Salt-grown cells heated at 55~85°C for 10 min, were not lysed by the enzyme. It was observed electron-microscopically that the surfaces of salt-grown cells were almost completely disrupted, whereas cells grown without salt kept almost their original shapes after the enzyme treatment.

Key words: 耐塩性酵母・Zymolyase・溶菌

緒 言

味噌及び醤油醸造に有用な耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を食塩添加培地に培養すると、無塩培地に培養した場合に比べて細胞が小さくなりその形態は球形に近いものからより楕円形に変化する^{1,2)}ことが観察されている。また、食塩添加培養により細胞壁構成成分の中でタンパク質含量が増加し逆にキチン質及びマンナン含量が減少する³⁾ことや菌体脂質組成が変化する⁴⁾ことが報告されている。著者ら⁵⁾は、前報で本菌の食塩添加培養菌体内に著量の UDP-N-acetylglucosamine が蓄積されることを見だし、そのことから食塩添加培養では glucosamine を必要とする細胞壁成分の生合成が抑制されていると推察した。このように本菌の細胞表層構造は食塩添加培養と無塩培養とで異なるものと考えられたので、両培養菌体間の酵母細胞壁溶解酵素に対する感受性の差異を検討した。その結果、前者は後者に比べてはるかに同酵素に作用され易いことを見いだしたのでその詳細について報告する。

実験方法及び材料

1. 供試菌株

Zygosaccharomyces rouxii ATCC 52698 を使用した。

2. 酵母菌体懸濁液の調製

培養条件等は前報⁶⁾に準じた。無塩培地として YM 培地を用い、同培地に食塩をそれぞれ 1, 2 及び 3 M となるように加えたものを食塩添加培地とした。各培養液において定常期に達した菌体を遠心分離し、蒸留水で2回洗浄した。洗浄菌体を適当量の蒸留水に懸濁し、その10倍希釈液の吸光度 (OD 800 nm) がほぼ1となるようにした。

加熱処理菌体の調製条件は次の通りである。上記菌体懸濁液を 55°C, 70°C 及び 85°C の湯浴中で10分間加熱後、遠心分離し、蒸留水で1回洗浄した菌体を蒸留水に再懸濁した (10倍希釈液の OD 800 nm = 1)。

3. 酵母細胞溶解率の測定

酵母細胞壁溶解酵素としては Zymolyase 20 T (キリ

ンビル社製)を使用した。同酵素を蒸留水に 10 U/ml の濃度となるよう溶解し、これを酵素溶液として用いた。

Zymolyase 処理基本条件は次の通りである。酵母菌体懸濁液 1 ml に M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.4) 5 ml, 酵素溶液 0.5 ml (5 U) 及び蒸留水 3.5 ml を加えて全量 10 ml とし、緩やかに振とうしながら 37°C で 3 時間処理した。

溶菌促進剤の添加試験には、上記酵素処理混液中の蒸留水の一部 (2 ml) に替えて 0.5 M Na₂SO₃ 溶液 2 ml (最終濃度, 0.1 M) あるいは 4 M KCl 溶液 2 ml (最終濃度, 0.8 M) を加えた混液を用いた。

処理混液の吸光度 (800 nm) を経時的に測定し、細胞溶解率は同吸光度の減少率 (%) で表した。なお細胞の凝集に起因する処理混液の濁度の低下については顕微鏡観察により溶菌によるものと区別した。

4. 酵母細胞の凝集

無塩及び 2 M 食塩添加培養菌体について、Zymolyase 添加量を 10 U とした以外は上述と同じ処理混液 10 ml をシャーレ (φ9 cm) に入れ、これを 37°C で 2 時間静置して菌体の凝集状態を肉眼で経時的に観察した。

5. 電子顕微鏡試料の作成と観察

無塩及び 2 M 食塩添加培養の定常期の菌体について、Zymolyase 処理した菌体と未処理の菌体それぞれを蒸留水で良く洗浄した後、常法によりグルタルアルデヒド、オスmium酸二重固定を行い、エタノールによる脱水後、凍結乾燥したものに金蒸着したものを標品とし、走査型電子顕微鏡 (明石 α-30 型 SEM) で観察した。

実験結果

1. 酵母培養の食塩濃度と菌体の溶菌

Fig. 1 に示したように Zymolyase 処理により無塩培養菌体混液の濁度はわずかに (反応 3 時間後に約 10%) 低下した。しかしこの濁度の低下は後述のように細胞の凝集に起因するものであり溶菌によるものではなかった。

一方、食塩添加培養菌体では培地の食塩濃度が高いほど溶菌され易かった。すなわち、1 M 食塩添加培養菌体では濁度は時間とともに緩やかに直線的に低下した (3 時間処理で約 30% 低下)。2 M 及び 3 M 食塩添加培養菌体では濁度は 1 時間処理で直線的に急激に約 40% 低下し、2 時間処理では約 50% 低下したが、以後の低下はほとんどなかった。なお食塩添加培養菌体には無塩培養菌体に見られた細胞の凝集は認められなかった。

2. 酵母菌体の生育相と溶菌

酵母生細胞に対する溶解酵素の作用は菌種、菌体の生

Fig. 1 Lysis of viable cells of *Zygosaccharomyces rouxii* by Zymolyase.

○: cells grown without salt, ●: 1 M NaCl-grown cells, ⊕: 2 M NaCl-grown cells, ⊙: 3 M NaCl-grown cells. Zymolyase 20 T dissolved in water at the concentration of 10 U/ml was added to the reaction mixture, respectively. A mixture containing 1 ml of yeast cell suspension (OD₈₀₀ of the 10-fold dilute suspension ≅ 1), 5 ml of M/15 phosphate buffer (pH 7.4), 3.5 ml of water and 0.5 ml of the enzyme solution was incubated at 37°C for 3 hr with gentle shaking. Then the optical density of the mixture was measured at 800 nm. Susceptibility was expressed as percent decrease in OD of the reaction mixture.

Fig. 2 Lysis of yeast cells cultivated for various periods by treatment with Zymolyase.

a: cells grown without salt (○: cultivated for 1 day, ●: for 3 days, ⊙: for 5 days)
b: 2 M NaCl-grown cells (⊙: cultivated for 2 days, ●: for 5 days, ○: for 14 days)
*: The drastic decrease in OD was caused by the marked flocculation of cells.

The procedure of Zymolyase treatment was the same as described in Fig. 1.

育相及び培養条件等によって影響される。一般に、対数期の菌体は定常期の菌体より溶菌され易い。そこで、本菌株の無塩及び 2 M 食塩添加培養について各生育相の菌体の溶菌状態を調べた (Fig. 2)。無塩培養では、1 日培養の菌体は 3 日及び 5 日培養の菌体に比べて極めて高い濁度低下率を示した (Fig. 2-a)。しかしながら、対数期の菌体 (1 日培養) のこの濁度低下は細胞の著しい凝集に起因するものであり溶菌によるものではなかった。定常期の菌体 (3 日及び 5 日培養) に見られた若干の濁度低下も微弱な凝集によるものであり、溶菌によるもの

Fig. 3 Lysis of heat-treated yeast cells by treatment with Zymolyase.

a : cells grown without salt, b : 2M NaCl-grown cells
○ : not treated, ● : treated at 55°C for 10 min, ◎ : at 70°C for 10 min.

The procedure of Zymolyase treatment was the same as described in Fig. 1.

ではなかった。データは省略するが、定常期の菌体も酵素濃度を高くすると (10 U/10 ml) 対数期の菌体とほぼ同様に著しい凝集を示した。凝集した菌体は、さらに酵素濃度を高くしても (20 U/10 ml) あるいは酵素処理時間を長くしても (6 時間), 溶菌されなかった。一方, 2M 食塩添加培養菌体では, 対数期の菌体 (2 日培養) の濁度低下が最も著しかったが, 定常期 (5 日及び 14 日培養) の菌体もほぼ同様の濁度低下を示した (Fig. 2-b)。これらの濁度低下はいずれも凝集によるものではなく, 溶菌によるものであった。

3. 加熱処理菌体の溶菌

加熱処理した無塩及び 2M 食塩添加培養菌体の Zymolyase に対する感受性について検討した結果を Fig. 3 に示した。無塩培養菌体を 85°C で処理したものは生菌体と同様にほとんど溶菌されなかった (Fig. 3-a)。一方, 2M 食塩添加培養菌体では, 無処理の生菌体は強く溶菌されたが, 加熱処理温度が高いほど溶菌されにくくなり 85°C の処理ではほとんど溶菌されなくなった。

4. 溶菌促進剤の添加効果

KITAMURA ら⁷⁾は, パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に対する Zymolyase の溶菌作用は Na_2SO_3 または KCl の添加によって促進され, さらに両化合物によって相乗的に促進されることを報告している。本菌株の無塩培養菌体と 2M 食塩添加培養菌体の溶菌に及ぼすこれらの化合物の添加効果を検討した (Fig. 4)。無塩培養菌体では Na_2SO_3 の添加により濁度は急激に低下した。この濁度低下は, 対数期の菌体に認められたのと同様に, 著しい凝集によるものであり溶菌によるものではなかった。KCl を添加しても濁度はほとんど低下しなかった (Fig. 4-a)。一方, 2M 食塩培養菌体は, Na_2SO_3 を添加

Fig. 4 Effect of Na_2SO_3 or KCl addition on lysis of yeast cells by treatment with Zymolyase.

a : cells grown without salt, b : 2M NaCl-grown cells
● : Na_2SO_3 (final, 0.1M) added, ○ : KCl (final, 0.8M) added

* : The decrease in OD was caused by the marked flocculation of cells.

The procedure of Zymolyase treatment was the same as described in Fig. 1, except for the addition of the indicated reagent to the mixture.

しても無添加時 (Fig. 2-b) とほぼ同程度に溶菌されたが, KCl を添加するとほとんど溶菌されなかった。いずれの場合も凝集は認められなかった (Fig. 4-b)。

5. Zymolyase 処理による酵母細胞の凝集

1, 2 及び 4 で述べたように, 本菌株の無塩培養菌体は Zymolyase 処理により著しい凝集を示したが, 食塩添加培養菌体は凝集しなかった。Zymolyase 処理による菌体混液の変化を経時的に観察した (Fig. 5, 6)。無塩培養菌体は処理 1 時間でかなり凝集し, 2 時間後には Fig. 5 (b) に示したようなフロックを形成した。2M 食塩添加培養菌体には凝集はなく 2 時間後には Fig. 6 (b) に示したように混液の濁度低下が肉眼でも観察された。

光学顕微鏡観察によれば, 凝集した無塩培養菌体 (2 時間 Zymolyase 処理) の個々の細胞はほぼ完全な形を保ち, また細胞壁の溶解も認められなかった。一方, 2M 食塩培養菌体の細胞壁はほとんど溶解されていた。

Fig. 5 Flocculation of yeast cells grown without salt by treatment with Zymolyase.

Photo(a) : incubated for 2 hr without Zymolyase, Photo (b) : incubated for 2 hr with 10 U of Zymolyase. The mixture was incubated statically at 37°C in a Petri dish, respectively.

Fig. 6 Flocculation of 2 M NaCl-grown yeast cells by treatment with Zymolyase.

Photo(a): incubated for 2 hr without Zymolyase, Photo (b): incubated for 2 hr with 10 U of Zymolyase. Incubated as described in Fig. 4.

Fig. 7 Morphological changes of viable cells of *Z. rouxii* grown without salt by treatment with Zymolyase for 3 hr.

(a) and (b) show the viable cells before and after the reaction, respectively.

The viable cells were prepared by cultivating in YM medium and harvesting in the stationary phase. For SEM examination, the viable cells were fixed with 2.5 % glutaraldehyde and 1% osmium tetroxide.

6. SEM による溶菌状態の観察

Zymolyase 処理した無塩及び 2 M 食塩添加培養菌体を SEM により観察し、未処理のものと比較検討した (Fig. 7, 8)。無塩培養菌体では細胞表層は 3 時間処理で部分的に溶解されていたが細胞の原形は良く保たれていた (Fig. 7 (b))。一方、2 M 食塩培養菌体では細胞表層は 1 時間処理でほぼ完全に溶解された (Fig. 8 (b))。

Fig. 8 Morphological changes of viable cells of *Z. rouxii* grown on 2 M NaCl medium by treatment with Zymolyase for 1 hr.

(a) and (b) show the viable cells before and after the reaction, respectively. Except for cultivating in the 2 M NaCl medium, the procedures were the same as described in Fig. 6.

考 察

食塩高張培地に培養した本菌の細胞の表層は通常の低張培地に培養したものに比べてかなり変化していると予想される。東らは⁸⁾、SEM により本菌の細胞表層を観察し、塩類に対する防壁としての細胞壁の役割を論じている。一般に微生物が食塩高張下に生育するためにはより強固な細胞壁が必要であると考えられがちである。しかしながら、高張培地における本菌の生育温度の上昇⁹⁾ やスクレオチドプールの増大⁵⁾ から判断すると、むしろ食塩添加培養細胞の表層は無塩培養細胞に比べてより活性的かつ不安定な状態にあると考えられる。Fig. 1 の結果は本菌の無塩培養細胞の表層構造は食塩添加培養細胞に比べて Zymolyase に対してより安定であることを示している。Zymolyase の酵母細胞に対する作用機作はまだ十分明らかにはされていないが、パン酵母では、まず protease (Zymolyase B) によって細胞表層のタンパク質が部分的に溶解されることにより β -1, 3-glucanase (Zymolyase A) の細胞壁 glucan 層への侵入が促進され溶菌に至ると考えられている¹⁰⁾。OBATA ら¹¹⁾ も酵母生菌体の溶菌には protease の作用が必須であると報告し

ている。食塩添加培養菌体が加熱処理によって溶菌されなくなる (Fig. 3-b) のは、表層タンパク質が変性し、protease に作用されにくくなったためと思われる。Zymolyase 処理時に、酵素濃度を高めるかあるいは処理混液に Na_2SO_3 を添加すると、無塩培養菌体は溶菌には至らないが著しく凝集した。一方、食塩添加培養菌体は Na_2SO_3 の添加の有無にかかわらず凝集することなく溶菌された。酵母の凝集現象は十分に解明されていないが、相補結合による性的凝集¹²⁾や細胞表層の物理化学的性質 (疎水の相互作用やイオン結合等) に起因するもの¹³⁾等が報告されている。無塩培養菌体は潜在的に細胞凝集能を有すると考えられ、一方食塩培養菌体は本質的に凝集能を欠いていると思われる。Zymolyase によるパン酵母の溶菌は Na_2SO_3 によって促進されることが知られ、これは同化合物の還元力による細胞表層タンパク質の S-S 結合等の解離に基づくものと考えられている⁷⁾。本菌株の無塩培養菌体は Na_2SO_3 を添加しても溶菌されなかったが、その凝集は促進された。これは Na_2SO_3 の還元作用により同菌体の Zymolyase に対する感受性が若干高まったことを示唆している。食塩培養菌体の溶菌が Na_2SO_3 によって影響されないのは、同細胞表層にはタンパク質の S-S 結合のような Na_2SO_3 に sensitive な構造が少ないためと思われる。以上のことから本菌株の無塩培養と食塩添加培養菌体間の Zymolyase に対する感受性の差異は表層タンパク質の構造や特性の違いによるところが大きいと考えられた。 Na_2SO_3 と KCl が本菌の溶菌に対して促進効果を示さないことは *Z. rouxii* と *S. cerevisiae* の細胞表層構造の違いを示唆するものである。今後、本菌の耐塩性と細胞表層マンナン-タンパク質複合体の構造との関連や細胞壁キチン質の構造とその役割について検討する必要があるだろう。

要 約

1. *Z. rouxii* ATCC 52698 の食塩添加培養菌体は Zymolyase により強く溶菌されたが、無塩培養菌体はほとんど溶菌されなかった。

2. Zymolyase 処理により食塩添加培養では対数期、定常期の菌体とも凝集することなく強く溶菌された。無塩培養では対数期の菌体の方が定常期のものより凝集し易かったがいずれも溶菌しなかった。

3. 食塩添加培養菌体も加熱処理を施すと Zymolyase によってほとんど溶菌されなくなった。

4. Zymolyase 処理時に Na_2SO_3 を添加すると定常期の無塩培養菌体も対数期の菌体と同様に著しく凝集したが、溶菌促進効果は見られなかった。また、食塩添加培養菌体の溶菌に対する Na_2SO_3 の促進効果も認められなかった。

5. SEM 観察によれば、Zymolyase 処理後の無塩培養細胞はほぼ元の細胞形を保っていたが、食塩添加培養細胞の表層部分はほぼ完全に溶解されていた。

文 献

- 1) 東 和男, 山本 泰, 好井久雄: 醸協, 83, (2) 127 (1988)
- 2) T. HAMADA, F. NODA, K. HAYASHI: *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 708 (1984)
- 3) 東 和男, 山本 泰, 好井久雄: 日食工誌, 31, 225 (1984)
- 4) Y. WATANABE, M. TAKAKUWA: *J. Ferment. Technol.*, 95, 365 (1987)
- 5) 富田 実: 醸協, 83, (11) 770 (1988)
- 6) 富田 実: 醸酵工学, 57, 195 (1979)
- 7) K. KITAMURA, Y. YAMAMOTO: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1761 (1981)
- 8) 東 和男, 山本 泰, 好井久雄: 醸協, 82, (2) 121 (1987)
- 9) H. ONISHI: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 351 (1959)
- 10) K. KITAMURA: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 963 (1982)
- 11) T. OBATA, H. IWATA, Y. NANBA: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2387 (1977)
- 12) 吉田和夫, 柳島直彦: 蛋白質核酸酵素, 22, 171 (1977)
- 13) K. KAMATA, M. MURATA: *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2423 (1984)