耐塩性キラー酵母 *Debaryomyces hansenii* TK-5 の キラー毒素の生産性とその安定化

三輪 昭生・伊藤 寛*・新国 佐幸**

(岡山県工業技術センター今保庁舎, *東京農業大学醸造科,

**農林水産省食品総合研究所)

平成 3 年 11 月 2 日受理

Production and Stabilization of *Debaryomyces hansenii* TK-5 Killer Toxin Studies on Halotolerant Killer Yeast (Part 2)

Akio MIWA, Hiroshi ITO* and Sayuki NIKKUNI**

(Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 661-2, Imabo Okayama-shi, Okayama, Japan, 701-01, *Department of Brewing, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka Setagaya-ku, Tokyo, Japan, 156, **National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305, Japan)

Effects of inorganic salts, sugars and amino acids were studied on the production and stability of killer toxin produced by a halotolerant killer yeast.

Activity of the killer toxin in filtered culture broth of *Debaryomyces hansenii* TK-5 was increased by the addition of potassium chloride, magnesium chloride, potassium phosphate and calcium chloride, respectively, to the culture medium.

Especially, the activity of the filtrate was increased 8 times by the addition of 200 mM potassium chloride to the culture medium. The heat and pH stability of the killer toxin was increased by the addition of sugar, sugar alcohol, ammonium sulfate and sodium chloride, respectively. The killer toxin was found to be markedly stabilized in the presence of 20 to 50% inositol. However, the activity of the killer toxin was inhibited by the addition of arginine, histidine and glutamic acid, respectively.

Key words : 耐塩性キラー酵母・食塩・キラー毒素

緒 言

耐塩性のキラー酵母としては KAGIYAMA ら¹⁾が *Hansenula anomala* を, SUZUKI ら^{2,3)}が *Pichia farinosa* を分離・同定している。これらのキラー毒素は分離・精製され, その性質や分子量などが明らかにされ, 耐塩性酵母間の拮抗現象に関与するものとして研究が進められている。しかし, 非耐塩性酵母である *Saccharomyces cerevisiae* などのキラー酵母⁴⁾に比べるとその作用機作などについては不明な点が多い。

これまでに, 我々は漬物から耐塩性キラー酵母 *Debaryomyces hansenii* を分離し, キラースペクトルや pH・

耐塩性キラー酵母に関する研究 (第 2 報)

熱安定性などを調べ報告⁵⁾してきた。そのキラー活性は食塩濃度に依存するが, 保存中常温では不安定であることを明らかにした。

また, この耐塩性キラー酵母は食塩を含まない YM 培地で継代培養した場合, キラー毒素の生産能は低下していくことを認めた。そこで, このキラー毒素の安定的な生産や活性の安定化に関与する物質を検索した。

実 験 方 法

1. 使用菌株

耐塩性キラー酵母は前報で漬物より分離した *Debaryomyces hansenii* TK-5⁵⁾ を用い, 感受性菌として

Hansenula anomala H 23⁵⁾ を用いた。

2. 粗キラートキシン溶液の生産方法

食塩 0.5 M を添加した YM 培地 (10% 乳酸で pH 4.8 に調整) に供試菌を接種し, 30°C, 24 時間, 200 rpm で振盪培養した。この培養液を 0.2 μ m のメンブレンフィルターで無菌濾過して粗キラートキシン溶液とし, これを必要濃度に希釈して実験に使用した。

3. キラー活性の測定方法

キラー活性の測定は, 次の方法で行った。KAGIYAMA^らの培地を一部改変した活性測定用の寒天平板培地 (食塩添加 YE_{PD} 培地: グルコース 2.0%, 酵母エキス 1.0%, ポリペプトン 1.0%, 1 M クエン酸-リン酸緩衝液 [pH 4.5] 10.0%, メチレンブルー 0.003%, 食塩 2.0 M, 寒天 2.5%) に直径 8 mm の穴を開け, 10⁵ cells/ml に調整した感受性菌を全面に塗布した。そこに, 粗キラートキシン溶液を直径 8 mm の穴に 200 μ l 注入した。これを 25°C で培養後, 形成される阻止円の直径を求めた。活性の単位は, カビサイジン (日本製薬 (株) 製) 10 mg/100 ml の溶液 200 μ l を同様に添加し, 試料と同じ条件下で形成される阻止円の直径を 1 Unit として示した。

4. 活性半減時間の計算

キラートキシンの処理時間を X , 残存活性の変化を Y として最小二乗法でその関係式 (1) を求め, Y 切片 b (測定開始直後の活性) の 1/2 を求めた関係式に代入して, 活性半減時間を算出した。

$$Y = aX + b \quad (1)$$

5. 菌体濃度の測定法

菌体濃度は, 粗キラートキシン溶液の生産で述べた供試菌の培養液を希釈後, 660 nm の吸光度で測定した。

実験結果および考察

1. キラートキシンの生産性向上

キラートキシンの安定的な生産をはかるため, まず, 食塩添加 YM 培地に各種の無機塩類 20 mM を添加して培養し, キラートキシンの生産性を調べた。塩化カリウム, リン酸 2 水素カリウム, 塩化マグネシウムならびに塩化カルシウムの添加がキラートキシンの生産性向上に顕著な効果を示し, 塩化ストロンチウム, 塩化バリウムおよび界面活性剤の Tween 80 にも弱いながら効果が認められた。一方, マンガン, 鉄, コバルト, ニッケル, 銅, 亜鉛, およびスズの塩化物の添加には効果は認められなかった。

そこで, キラートキシンの生産性向上に効果があったこれら塩類の最適添加濃度を求めた。これらの無機塩類を 10~200 mM の範囲で添加することにより, キラート

Table 1 The optimum concentrations of inorganic salts in medium for production of the killer toxin and growth of *D. hansenii* TK-5.

Reagent	Killer activity		Growth	
	Optimum concentration	Relative activity	Optimum concentration	Rate of growth (control=1)
Control	—	1.0	—	1.0
KCl	200 mM	8.1	10 mM	2.2
MgCl ₂	10 mM	5.6	10 mM	1.1
KH ₂ PO ₄	20 mM	2.6	20 mM	2.4
CaCl ₂	5~10 mM	3.0	10 mM	1.7
SrCl ₂	5 mM	1.4	5 mM	1.3
BaCl ₂	1 mM	1.4	1~2 mM	1.5
Tween 80	0.01%	1.2	0.01%	2.0

キシンの生産性は無添加の時に比べて約 1.2~8 倍上昇することが認められた (Table 1)。また, キラートキシン生産のための最適添加濃度は, キラー酵母の増殖のための最適添加濃度とほぼ一致することが認められた。ただ, 塩化カリウムについてはキラー酵母の増殖の最適濃度よりキラートキシンの生産のための最適濃度が明らかに高いことが認められた。

また, Table 1 に示したように耐塩性キラー酵母の増殖に最適の培地組成 (Na⁺ 1.15 g/dl, K⁺ 0.04 g/dl, Mg²⁺ 0.02 g/dl, Ca²⁺ 0.04 g/dl, Cl⁻ 1.95 g/dl) は, 海水のイオン組成⁶⁾ (Na⁺ 1.09 g/dl, K⁺ 0.04 g/dl, Mg²⁺ 0.32 g/dl, Ca²⁺ 0.04 g/dl, Cl⁻ 1.97 g/dl) と非常に似ていることが認められた。

D. hansenii は海水中に広く分布している海洋酵母で, 天日製塩の工程から塩蔵食品に移行することが報告されている⁷⁾。供試耐塩性キラー酵母の増殖のための最適塩組成と海水のそれが, よく似ていることから, この供試酵母は漬物から分離されたが, 海洋から同様の経路を辿って漬物に移行したのと考えられる。

2. キラートキシンの安定性の向上

1) キラートキシンの熱安定性

前報⁵⁾において, キラートキシンの熱安定性を調べた結果, 50°C, 15 分で活性を失うことがわかった。そこでさらに, *D. hansenii* TK-5 のキラートキシンの安定性向上の検討のために, まずその熱安定性を調べた。粗キラートキシン溶液をそれぞれの温度で所定の時間処理後, その活性を測定した。この結果を Fig. 1 に示した。

4°C では約 1 週間, キラートキシンの活性はほとんど変化がなかった。30°C では時間の経過とともに活性の低下が認められ, 35°C では 5 日間, 40°C では 12 時間でキラートキシンは活性を示さなくなることが認められた。

Fig. 1 Heat-stability of the killer toxin.

The crude killer toxin solution was incubated at 4°C (○), 30°C (●), 35°C (△) and 40°C (▲), respectively.

2) キラートキシンの活性安定化剤の検索

キラートキシンの活性安定化剤を検索するために粗キラートキシン溶液に、種々の物質を添加して 40°C で 12 時間処理し、その活性を測定した (Table 2)。

糖や糖アルコールの添加はその濃度に比例し、キラートキシンの安定化への寄与が認められた。特にイノシトールはその効果が顕著で 5% 添加でもキラートキシンの活性を保護する効果が認められた。

また、無機塩類では 10% の塩化ナトリウムおよび 5% と 10% の硫酸にキラートキシンの活性を保護する効果が認められた。しかし、20% の塩化ナトリウムや硫酸の添加では保護効果が認められずキラートキシンは活性を失うことが認められた。

3) キラートキシンの活性安定化剤の最適濃度

保護効果の認められたイノシトール、グリセロール、硫酸および塩化ナトリウムについて、さらにその添加濃度を変えて、40°C で処理した時のキラートキシンの活性半減時間を調べた。なお、硫酸や食塩を加えたサンプルは 40°C で処理後、透析により脱塩してから残存活性を測定すべきであるが、脱塩過程での失活が著しいので透析は行わず、40°C で処理後すぐに残存活性の測定を行った。

粗キラートキシン溶液にイノシトールを 20% 以上添加して 40°C で処理すると、Fig. 2 に示すように活性の半減時間は約 57 時間まで延長され、供試した化学活性保護物質の中で最も強いキラートキシンの活性保護作用が認められた。一方、グリセロールは添加濃度に比例して活性の半減時間が延長されていくことが認められた。

次に、硫酸・食塩を粗キラートキシン溶液に添加して 40°C で処理した結果を Fig. 3 に示す。これらは脱塩を行えなかったため添加濃度に比例して初発の残存活性が増大し、イノシトールよりも高い残存活性を示したが、失活が著しく活性の半減時間はイノシトールに比べて短

Table 2 Effects of various reagents on heat-stability of the killer toxin.

Reagent	Killer activity	Reagent	Killer activity
Inositol		NaCl	
5%	+	5%	—
10%	++	10%	++
20%	+++	20%	—
Glycerol		KCl	
5%	—	5%	—
10%	++	10%	—
20%	+++	20%	—
Fructose		MgCl ₂	
5%	—	5%	—
10%	++	10%	—
20%	+++	20%	—
Sorbitol		CaCl ₂	
5%	—	5%	—
10%	++	10%	—
20%	+++	20%	—
Glucose		(NH ₄) ₂ SO ₄	
5%	—	5%	++
10%	++	10%	++
20%	+++	20%	—
Maltose		Riboflavin	
5%	—	5%	—
10%	++	10%	—
20%	+++	20%	—
Sucrose		Albumin	
5%	—	0.25%	—
10%	++	0.5%	—
20%	+++	1.0%	—
Mannitol		EDTA	
5%	—	5 mM	—
10%	++	10 mM	—
20%	+++	20 mM	—
Acetone		2-Mercaptoethanol	
5%	—	5 mM	—
10%	—	10 mM	—
20%	—	20 mM	—
Ethanol		L-Cysteine	
5%	—	5 mM	—
10%	—	10 mM	—
20%	—	20 mM	—
Ethylene glycol		Glutathione	
5%	—	5 mM	—
10%	—	10 mM	—
20%	—	20 mM	—
Polyethylene glycol		DL-Dithiothreitol	
5%	—	0.5 mM	—
10%	—	1 mM	—
20%	—	2 mM	—

After incubation of the killer toxin solutions containing various concentrations of reagents at 40°C for 12 hr, the killer activity was assayed.

Fig. 2 Effect of inositol or glycerol concentration on stability of the killer toxin.

The crude killer toxin solution with the addition of inositol (○) or glycerol (△) was incubated at 40°C.

かった。

硫安の場合は活性の半減時間が添加硫安濃度とともに増加し、30% 飽和硫安の添加時に活性の半減時間は最大の 25 時間に延長された。しかし、30% 飽和硫安以上で処理すると、粗キラートキシン溶液は硫安濃度に比例して混濁し、活性の半減時間が低下することが認められた。

この現象は高濃度硫安のためキラートキシンが塩析によって凝集し、活性が低下したため生じたものと推察される。

食塩も硫安と同様、粗キラートキシン溶液に食塩を添加して 40°C で処理すると Fig. 3 に示すように、食塩の添加により活性の半減時間の遅延が認められたが、食塩濃度 30~40% で活性の半減時間は約 9 時間に延長され、それ以上の添加では逆に減少し、硫安ほどのキラートキシンの安定化への効果は認められなかった。

S. cerevisiae の生産するキラートキシンは糖や糖アルコールの存在によって安定化され、なかでもタンパク質や酵素の安定化に用いられるグリセロールにより顕著に安定化されたと報告⁷⁾されている。また、無機塩類のなかでは、16.5%の硫安が安定化の最適濃度であることが報告⁸⁾されているが、このキラートキシンのように 30% 飽和硫安ほどの高濃度ではない。このことから、このキラートキシンは、糖および糖アルコールのみならず、高濃度の硫安や食塩によっても安定化されることが認められた。

4) キラートキシンの pH 安定性に対する安定化剤の効果

イノシトールと硫安がキラートキシンの安定化に顕著な効果があることが認められたので、次にキラートキシンの pH 安定性へのイノシトール、硫安の添加効果について調べた。

粗キラートキシン溶液にイノシトール（最終濃度 30

Fig. 3 Effect of ammonium sulfate or sodium chloride concentration on stability of the killer toxin.

The crude killer toxin solution with the addition of ammonium sulfate (○) or sodium chloride (△) was incubated at 40°C.

%) あるいは硫安（最終濃度 30% 飽和）および 1 M クエン酸-リン酸緩衝液を 30% 加えて pH を 3~6 に調整し 40°C で 4 時間処理を行った。この際、透析により脱塩してから残存活性を測定すべきであるが、先に述べたように脱塩過程での失活が著しいので透析は行わず、40°C で処理後、pH だけ再調整 (pH 4.5) して残存活性を測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

硫安やイノシトールを含まない場合、pH 3.5 以下や 4.5 以上では活性は示されず、pH 4.0 付近で約 25% の残存活性が認められた。イノシトールを加えることにより、pH 4 付近での残存活性が上昇し、pH 3.5 や pH 4.5 でも残存活性が認められ、イノシトールの pH 安定化への効果が認められた。pH の安定性に対し硫安の添加は、イノシトール以上の効果が認められ、pH 4 付近ではイノシトールの 2 倍以上の残存活性が認められた。さらに、pH 5 付近の高い pH 領域の安定性も増大した。

しかし、硫安は先に述べたように、脱塩を行えなかったため添加濃度に比例して初発の残存活性が増大し、イノシトールよりも高い残存活性を示したものと推察され

Fig. 4 Effect of inositol or ammonium sulfate on pH-stability of the killer toxin.

The crude killer toxin solution containing 30% (w/w) Inositol (△) or 30% saturation of ammonium sulfate (□) was incubated at 40°C for 4 hr (○, control).

る。

3. キラー毒素の活性阻害剤

次に、キラー毒素の活性を阻害する物質を調べるためにオキザノグラフ法⁹⁾を参考に、通常の活性の測定方法を改変して、キラー毒素の活性阻害剤を検索した。

粗キラー毒素溶液で感受性菌を 10^5 /ml に希釈し、活性測定用の平板寒天に塗布した。その平板寒天に直径 8 mm の穴を開け、試料溶液 (1 M 濃度) 200 μ l を注入し、25°C で 72 時間培養し、感受性菌の増殖の有無を観察した。

この結果を Fig. 5 に示した。キラー毒素が作用している部分では、感受性菌の増殖は見られないが、キラー毒素を阻害するアミノ酸溶液の周囲には、増殖円が認められた。この増殖円が観察されたのは、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、ポリペプトンで、その効果はアルギニン>グルタミン酸>ヒスチジン>ポリペプトンの順で高かった。また、アルギニン、ヒスチジンにドーナツ状の増殖円が観察された。

これらのアミノ酸のなかでグルタミン酸は、醤油や味噌などの含塩発酵食品中の含量が最も高く¹⁰⁾、このキラー毒素のこれらの食品への応用を考えるとグルタミン酸の影響は重要である。また、グルタミン酸は微生物の凍結乾燥保護剤¹¹⁾としても使用されていることから、次にグルタミン酸の濃度がキラー現象におよぼす影響を検討した。

この結果、グルタミン酸は添加量が増加するとキラー感受性菌の増殖を促進するので相対的にキラー毒素の活性は低下していき、100 mM の添加では活性を示さなくなった (Fig. 6)。

献本¹²⁾は好塩微生物の耐塩性機構として、食塩濃度が高くなって培地中の浸透圧が上昇するとそれに適応するために、微生物は細胞内に高濃度の K^+ とその対イオンとしてのアミノ酸を蓄積すること、そしてそのアミノ酸プールの主成分はグルタミン酸やプロリンであることを報告している。このことから、グルタミン酸が培地中に豊富に存在すると、感受性菌はグルタミン酸等のアミノ酸を取り込み、多量に菌体内に蓄積させ、その耐塩性が増強されることが推察される。このため感受性菌はキラー毒素の作用を受けにくくなったのではないかと推察され、本キラー毒素の作用機作に耐塩性機構が関係しているのではないかと考えられるが、明らかにするためには、さらに検討する必要がある。

要 約

耐塩性キラー酵母 *Debaryomyces hansenii* TK-5 のキ

Fig. 5 Effects of various amino acids, urea, ammonium sulfate, 2-ketoglutaric acid, and polypepton on killer activity of the killer toxin.

The concentration of each reagent was 1 M.

Fig. 6 Effect of glutamic acid concentration in YEPD-MB agar on killer activity.

ラー毒素の生産性と安定性の向上を検討した結果、以下のような知見が得られた。

1. 食塩添加 YM 培地に塩化カリウム、リン酸 2 水素カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウムを添加し培養することにより、キラー毒素の活性が上昇することが認められた。特に塩化カリウム 200 mM の添加により、活性が 8 倍程度上昇することが認められた。
2. キラー毒素の安定化には、糖、糖アルコール、硫安、塩化ナトリウムの添加が効果があり、熱安定性の向上には 20~50% のイノシトール、pH 安定性の向上には 30% 飽和の硫安の添加で顕著な効果が認められた。
3. アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸の添加により、キラー毒素の活性は低下した。

文 献

- 1) S. KAGIYAMA, T. AIBA, K. KADOWAKI and K. MOGI : *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1 (1988)
- 2) C. SUZUKI, S. NIKKUNI : *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2593 (1989)
- 3) C. SUZUKI, S. NIKKUNI : *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2599 (1989)
- 4) 大内弘造, 山本哲朗 : 微生物, 2, 1 (1986)
- 5) 三輪昭生, 伊藤 寛 : 味噌の科学と技術, 36, 25 (1988)
- 6) 増井正幹, 大西 博, 畝本 力 : 好塩微生物—生理・生態と応用と食品衛生—, 医歯薬出版(1979)
- 7) H. PHAFF, M. MILLER and E. MRAK 著, 永井進訳 : 酵母菌の生活, 学会出版センター (1982)
- 8) K. OUCHI, N. KAWASE, S. NAKANO and H. AKIYAMA : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1 (1978)
- 9) 長谷川武治編著 : 微生物の分類と同定, 改訂版, 学会出版センター (1984)
- 10) 野白喜久夫, 吉澤 淑, 鎌田耕造, 水沼武二, 蓼沼 誠編集 : 醸造の事典, 朝倉書店 (1988)
- 11) 根井外喜男編 : 微生物の保存法, 東京大学出版会 (1977)
- 12) 畝本 力 : 千葉大学腐敗研究所報告, 23, 1-29, (1970)