

澱粉資化性酵母の諸性質と同定*

赤木盛郎・河村龍二郎**
山田哲也***・中尾孝子

Morphological Characteristics, Physiological Properties and Identification of Yeast that Assimilate Starch

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

緒言

先報¹⁾において、自然界より澱粉資化性酵母の分離検索を行い、澱粉工場の土壌から資化能のすぐれた赤色酵母を得た。さらに、分離した赤色酵母から紫外線照射による変異株を誘起し、菌体外アミラーゼ生産の向上を検討した結果、野生株J株の第二代変異株J-5B株は、親株の10倍に相当するアミラーゼを菌体外に生産することを報告した。

本報では、この菌体外アミラーゼ生産のすぐれた赤色酵母の親株J株の形態学的、生理学的諸性質を調べ、同定を行い *Phodosporidium* sp. とした。また、この澱粉資化性酵母の紫外線照射によって得た変異株のアミラーゼ生産について若干の検討を行った。

実験方法

1. 赤色酵母J株の菌学的諸性質

菌学的諸性質は、主に Lodder 編「The Yeast」²⁾、長谷川武治編「微生物の分離と同定」³⁾、飯塚廣、後藤昭二著「酵母の分類同定法」⁴⁾を参考にして検討した。

1) 形態学的性質の検討

栄養細胞は、YM 培地（麦芽エキス0.3%、酵母エキス0.3%、ポリペプトン0.5%、グルコース1%）および YM 寒天斜面において28℃、3日間の静置培養を行ったものについて、その形態を観察した。また、コーンミール寒天（Difco 社製）斜面上においても室温で培養し、そ

* 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

の形態を観察した。

2) 生理学的性質の検討

発酵試験は、各供試糖 2%，酵母エキス 0.5%，ポリペプトン 0.7% の培地を使用し、Durham 管において発泡の有無を観察した。なお培養は 28℃，2 週間にわたって観察した。供試糖は Glucose, Galactose, Sucrose, Maltose, Lactose, Trehalose, Raffinose, Inulin である。

炭水化物の資化性は、Glucose, Galactose をはじめとする Table 3 に示した 30 種類の炭素化合物について、Bacto-yeast nitrogen base (Difco 社製) を培地として auxanographic plate で検討した。さらに、これによって資化性の認められなかった炭素化合物、生育の有無の判別しにくかったものおよび揮発性の強い Ethanol, auxanographic plate でのみ資化性を示す可能性のある Succinic acid, Citric acid については改めて液体培養での生育の有無により検討した。

硝酸塩の資化性試験には、Bacto-yeast-carbon base (Difco 社製) を用い、 KNO_3 を 0.078% 添加した培地で培養し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% 添加のものおよび無添加の培地での生育と比較して検討した。

炭素化合物および硝酸塩の資化性とビタミン欠乏培地での生育は、通常の液体培地での静置培養のほかに、ロータリーシェーカーを用いた振とう培養も併用した。これらの試験に使用した菌体は、YM 液体培養により増殖した菌体を無菌水で 5 回洗浄したものをを用いた。また、耐浸透圧性は、50% (w/w) の Glucose を含む Glucose-yeast-extract agar 上での生育の有無を観察した。

カロチノイド系色素の生産性は、YM 培地で 28℃，4 日間静置培養後、遠心分離 (4000rpm, 15分間) により菌体を回収し、洗浄後アセトン、石油エーテルで色素を抽出し、320~600 μ の吸収を測定した。

澱粉類似物質の生成、尿素の分解、ゼラチンの液化性、生酸性、アルブチンの分解についても文献^{2~4)}に順じて検討した。

3) 走査型電子顕微鏡観察試料の作製

YM 液体培地 30ml 中で 30℃，4 日間，160rpm の振とう培養を行い、遠心分離 (4000rpm, 15分間) により菌体を回収し、つぎの如く固定操作を行い観察した。1) 5% グルタルアルデヒドに 0.2% (w/v) となるようにタンニン酸を加え室温で約 6 時間処理する。2) 5% グルタルアルデヒドに 2% (w/v) となるようにタンニン酸を加え室温で 6 時間~1 夜処理する。3) 1 時間水洗する。4) 1% OsO_4 水溶液中で 3 時間~1 夜処理する。5) 1 時間水洗する。6) エタノール脱水 (30%, 50%, 70%, 90%, 95%) 各 20 分間処理する。7) 100% エタノール中で 3 回各 30 分間脱水する。8) イソ酢酸アミル処理として、100% エタノール：イソ酢酸アミル = 1 : 1 の溶液中で 3 回、各 10 分間処理する。その後イソ酢酸アミル中で 3 回それぞれ 10 分間処理する。9) 臨界点乾燥後、金蒸着を行い試料とする。

2. *Rhodosporidium* sp. J-5B 株の生産するアミラーゼに関する検討

1) 粗酵素標品の調製

小麦ふすま 5 %, 米糠0.5%の培地100ml を500ml 容三角フラスコに分注し, 常法通り殺菌後, Table 1 の培地で前培養した供試菌 (1×10^7 cells/ml) 1 ml を接種し, 28°C, 5 日間, 200rpm の振とう培養を行い, 菌体を遠心分離 (4000rpm, 15分間) により回収後, 上澄液に対し微量のメルカプトエタノールを添加し, 80%飽和の硫酸塩析を行った。ついで沈澱物を遠心分離 (8000rpm, 20分間) により集め, 0.02M の酢酸緩衝液に溶解後, 一昼夜流水中で透析し, 凍結乾燥を行い粗酵素標品とした。

Table 1. Composition of basal Medium.

Soluble starch	2.0 (%)
Polypeptone	0.7
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.01
pH	5.5

2) TLC による分解生成物の検討

2%馬鈴薯澱粉15ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 10ml, 粗酵素溶液 5 ml (20IU/ml) を40°C で反応させ, 経時的に TLC に供した。TLC は担体としてシリカゲル (イーストマンコダック社製), 展開溶媒として iso Pro-OH: Et-OH: 水 = 7 : 1 : 2 を用い, 発色は50%硫酸加熱処理で行った。

3) 至適 pH, pH 安定性, 至適温度, 熱安定性

pH 1 ~ 2 においては, 0.1M HCl/KCl 緩衝液, pH2.2~8.0においては, 0.1M McIlvaine 氏緩衝液, pH8.5~10.0においては, 0.1M Kolthof 氏緩衝液を使用し, 先報¹⁾で述べたアミラーゼ活性測定法により測定した。pH 安定性は各 pH において30°C, 24時間処理後の残存する活性を求め測定した。熱安定性は pH5.0, 10分間処理後の残存活性を求め測定した。

実験結果

1. 赤色酵母 J 株の菌学的諸性質

形態学的諸性質を Table 2 に, また生理学的諸性質を Table 3 に示した。

本菌の細胞形は Photo. 1 に示したように楕円形で, 大きさは (2.0~3.0) × (4.0~6.0) μ 程度であった。また, コーンミール寒天上室温で 2 週間培養したところ Photo. 2 に示したように菌糸のところどころにクランプコネクションを形成した。また同様の培養条件において菌糸

Table 2. Morphological Characteristics of *Rhodospiridium* sp. J.

Growth in YM-broth: after 3 days at 28°C, cell are oval sometimes long oval., (2.0–3.0) x (4.0–6.0) μ , and occurring singly or in pairs.

Growth on YM-agar: after 3 days at 28°C, cell are similar in size to those in YM-broth, the streak culture is orange to dark orange, the surface is smooth and glistening, the texture is soft to slightly mucous.

Growth on corn-meal agar: after 2 weeks at room temperature, the true mycelium have a clamp connections and terisporos.

Table 3. Physiological Properties of *Rhodospiridium* sp. J.

Fermentation	: Negative
Assimilation of carbon compounds:	
D-Glucose + , Sucrose + , Ethanol + , Inulin +	
D-Galactose + , Maltose + , Glycerol (+) , Salicin +	
D-Ribose + , Lactose - , Erythritol - , α -Methyl-D-glucoside +	
L-Rhamnose - , Cellobiose + , Ribitol (+) , DL-Lactic acid -	
L-Sorbose + , Trehalose + , D-Mannitol + , Succinic acid (+)	
D-Xylose + , Melibiose - , D-Glucitol + , Citric acid -	
D-Arabinose + , Raffinose + , Inositol - , Soluble starch +	
L-Arabinose + , Melezitose +	
Assimilation of potassium nitrate	: Positive
Splitting of arbutin	: Positive
Formation of carotenoid pigment	: Positive
Growth in vitamin-free medium	: Positive
Starch formation	: Negative
Hydrolysis of urea	: Positive
Liquefaction of gelatin	: Positive
Growth on 50% (w/w) glucose-yeast extract agar	: Negative
Acid Production on Chalk agar	: Negative

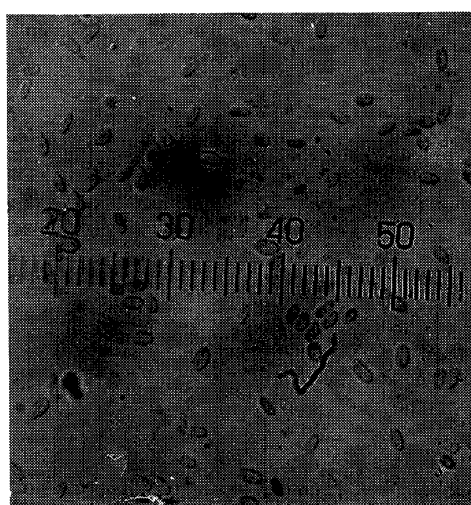


Photo. 1. J Strain.

Cultural condition: cultivation in YM medium at 28°C for 3 days.

One division shows 2.5 μ .

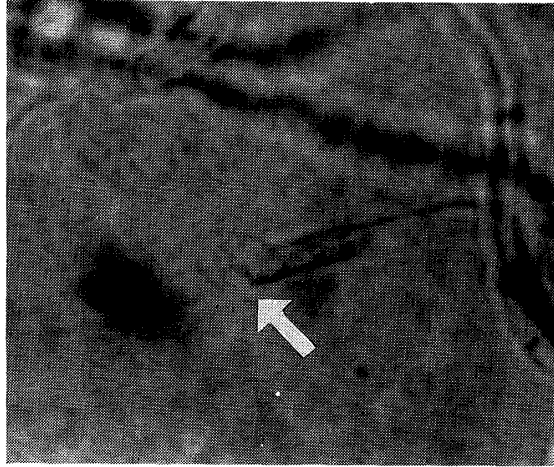


Photo. 2. Formation of Clamp Connection by J Strain.
Cultural condition: cultivation on corn-meal agar plate for 2 weeks.

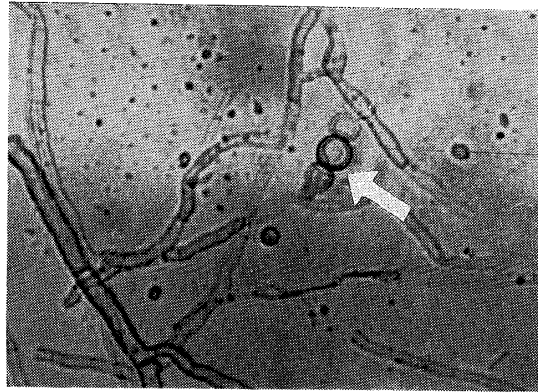


Photo. 3. Formation of Teliospore by J Strain.
Cultural condition: cultivation on corn-meal agar plate for 2 weeks.

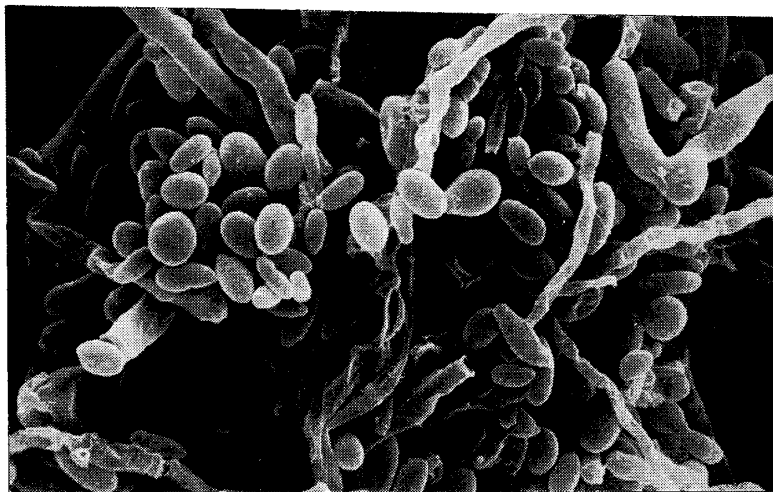


Photo. 4. J Strain grown in YM Medium.
×5000.

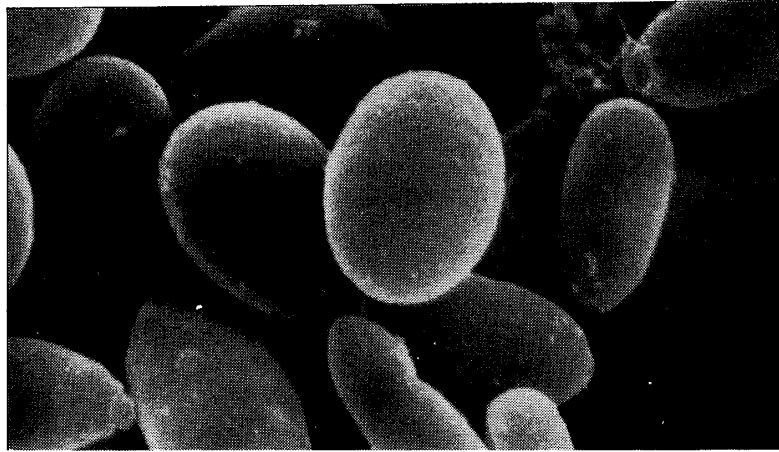


Photo. 5. J Strain grown in YM Medium.
×20000.

の先端および中間に Photo. 3 に示したようなテリオスポアを形成した。走査型電子顕微鏡観察を行った結果、Photo. 4 および Photo. 5 に示したように、菌体の表面はなめらかであった。さらに本菌は赤色酵母であり、菌体色素をアセトン、石油エーテルで抽出し調べた結果、その吸収曲線および最大吸収値 ($420\text{m}\mu$, $444\text{m}\mu$, $466.5\text{m}\mu$) から、カロチノイド系色素であることを確認した。

以上のごとくクランプコネクションを形成し、射出胞子を形成せずテリオスポアを形成し、かつ、カロチノイド系色素生産菌であることから文献²⁻⁴⁾の記載に基づき *Rhodosporidium* sp. と同定し、*Rhodosporidium* sp. J と命名した。

2. *Rhodosporidium* sp. J-5B 株の生産するアミラーゼ

先に調製した粗酵素を 2% 馬鈴薯澱粉に作用させ、経時的に TLC に供した結果を Fig. 1 に

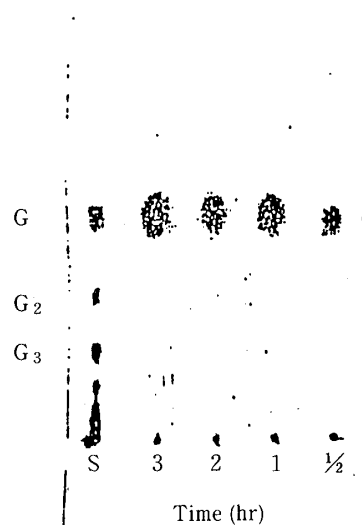


Fig. 1. A TLC of Hydrolysis Products from Potato Starch.

示した。反応1/2～3時間後において生成された糖はグルコースであり、また70%分解時においてもヨウ素澱粉反応は消失しなかった。粗酵素の至適 pH, pH 安定性, 至適温度, 熱安定性の検討結果はそれぞれ Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に示した。その結果至適 pH は pH 5 付近, 安定 pH 域は pH 3～7, 至適温度は50℃付近, 熱安定性については45℃付近まで安定であった。

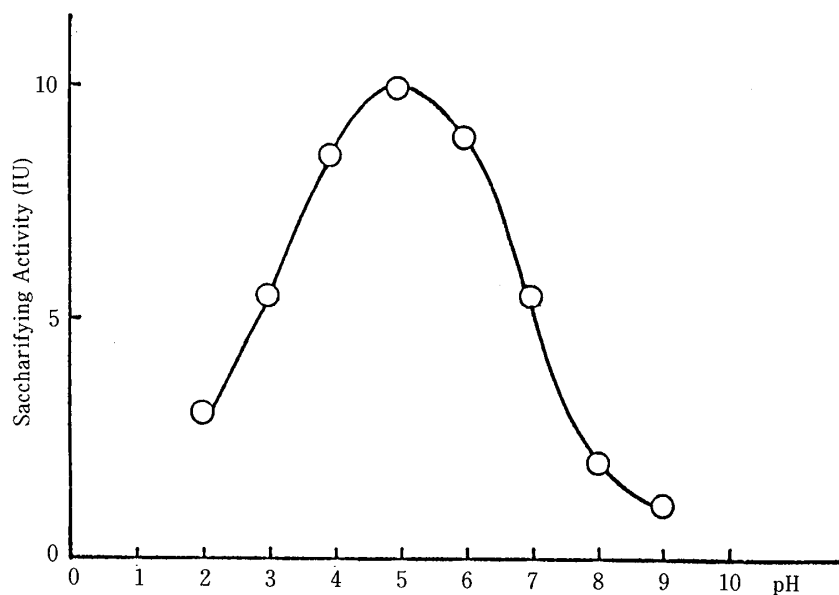


Fig. 2. Effect of pH on the Glucoamylase Activity.

Glucoamylase activity was estimated under the standard assay conditions at various pH.

McIlvaine buffer for pH 2.4–8.0

Kolthof buffer for pH 8.5–9.0

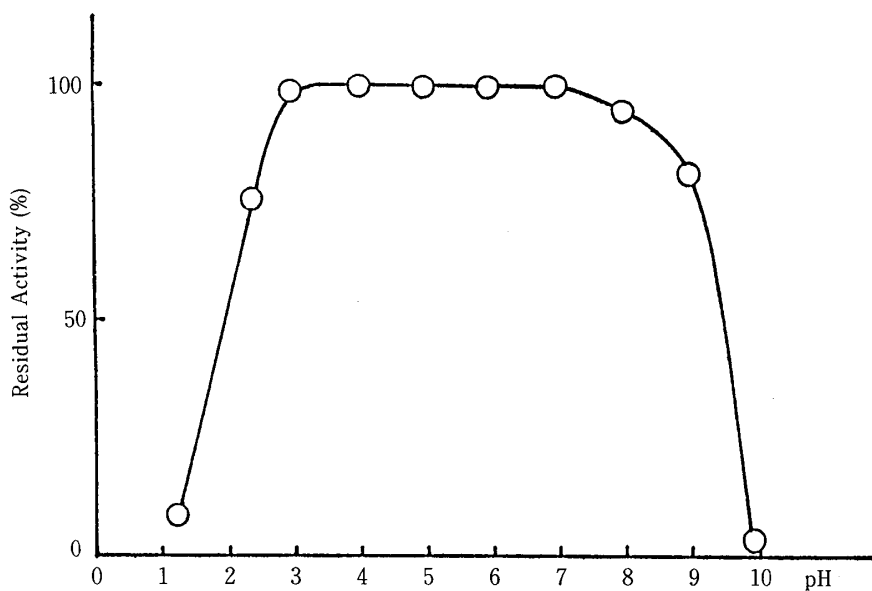


Fig. 3. Relation Between pH and Stability.

Residual activity after storage for 24 hr at 30°C.

HCl-KCl buffer for pH 1.0–2.0

McIlvaine buffer for pH 2.4–8.0

Kolthof buffer for pH 8.5–10.0

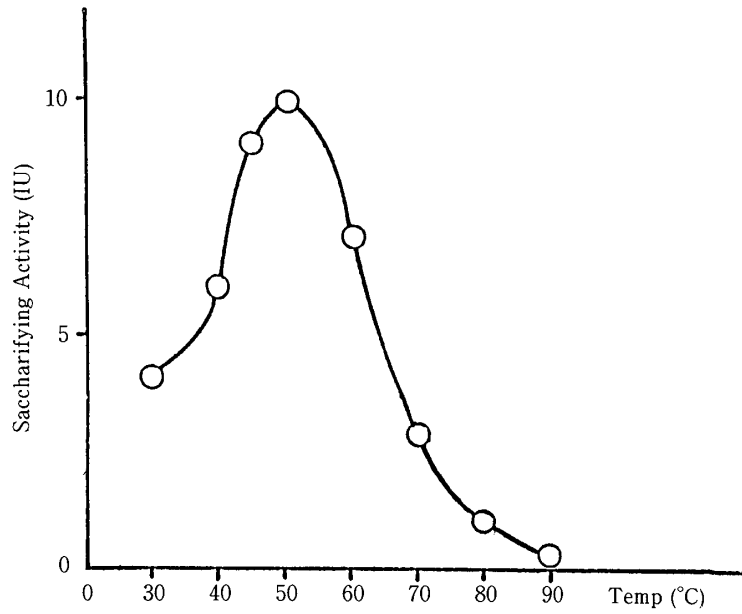


Fig. 4. Effect of Temperature on the Glucoamylase Activity. Glucoamylase activity was estimated under the standard assay condition at various temperature.

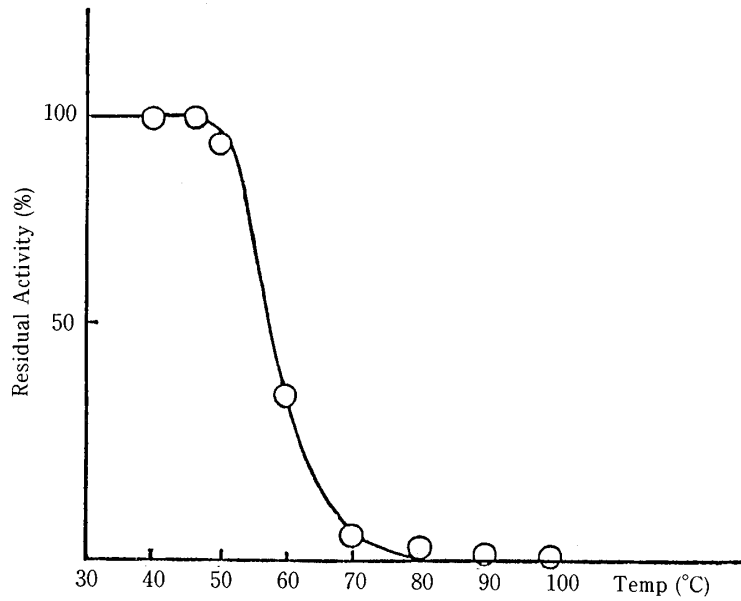


Fig. 5. Heat Stability of the Glucoamylase Activity. The reaction mixture was incubated, for 10min at various temperatures. After incubation, residual activity was estimated under the standard assay conditions.

考 察

Lodder 編 The Yeast²⁾ には *Rhodosporidium sphaerocarpum* および *Rhodosporidium toruloides* の 2 種が記載されている。分離酵母 *Rhodosporidium* sp. J との比較を Table 4 に示した。*Rhodosporidium sphaerocarpum* と *Rhodosporidium toruloides* との分類は、テリオスポアの形状が球状でな

めらかなものを *Rhodosporidium sphaerocarpum* に、角ばって不ぞろいのを *Rhodosporidium toruloides* に分類しているが、*Rhodosporidium* sp. J のテリオスポアが球状でなめらかであることから *Rhodosporidium sphaerocarpum* に近い種であることが考えられる。しかし、Soluble starch および Succinic acid の資化性を有し、ビタミンの要求性がないこと、ゼラチンの液化力を有するなどの点で異なり、またテリオスポアの形状や Soluble starch の資化性を有し、DL-Lactic acid, Citric acid の資化性を有しないなどの点で *Rhodosporidium toruloides* にも分類されず、*Rhodosporidium* sp. J を本属の新種と考えるのが妥当と思われた。

Table 4. Comparison of the Species.

	<i>Rhodosporidium</i> sp. J	<i>Rhodosporidium</i> <i>sphaerocarpum</i>	<i>Rhodosporidium</i> <i>toruloides</i>
Soluble starch	+	—	—
Succinic acid	+	—	+ (weak)
DL-Lactic acid	—	—	+ (weak)
Citric acid	—	—	+ (weak)
Growth in vitamin-free medium	+	—	+
Gelatin liquefaction	+	—	+ or —

Rhodosporidium sp. J の紫外線照射により得た変異株 *Rhodosporidium* sp. J-5B 株の生産するアミラーゼが、澱粉からグルコースを生成し、70%分解時にもヨウ素反応が消失しなかったことから、その大部分がグルコアミラーゼであることが分った。

要 約

野生株 J 株の形態学的、生理学的諸性質を検討し、同定を試みた結果 *Rhodosporidium* sp. に属することが明らかとなった。この属には、生理学的諸性質において本菌が該当する種がなく、本菌は *Rhodosporidium* 属の新種と考えるのが妥当と思われた。

紫外線照射によって得た *Rhodosporidium* J-5B 株の生産するアミラーゼについて検討し、グルコアミラーゼであることが判明した。

文 献

- 1) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 鈴鹿短大紀要, 10, 1 (1990)
- 2) J. Lodder (ed): "The yeast, A Taxonomic Study", 2nd ed., Amsterdam, Noth-Holland Publ. Co. 1970
- 3) 後藤昭二, 曾根田正己: 「微生物の分類と同定」, 学会出版センター, 1979
- 4) 飯塚 廣, 後藤昭二: 「酵母の分類同定法第三版」東京大学出版会, 1980