

ヒート・ショック法によるCandida utilis菌体の核酸含量の低減

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者	田島, 眞 高橋, 治男
巻/号	39号
掲載ページ	p. 77-79
発行年月	1982年1月

ヒート・ショック法による *Candida utilis* 菌体の核酸含量の低減

田島 眞・高橋 治男*

Reduction of Nucleic Acid Content in Yeast Cells (*Candida utilis*) by Heat-shock Process

Makoto TAJIMA and Haruo TAKAHASHI*

Yeast cells (*Candida utilis* IFO 0619) were grown on a medium containing glucose as a carbon source. After cultivation, cells were re-suspended in water and subjected to heat-shock at 68°C for 6 sec, at 50°C for 1 hr and finally at 55°C for 1 hr. Nucleic acid content of cells subjected to heat-shocked was 3.65% on a dry basis. Total and free amino acid contents in yeast cells were also determined. The free amino acid content in un-treated cells was only 0.059% of the total amino acid content. Whereas, that of cells subjected to heat-shock was 0.184%, which was about three times as much as that of un-treated cells. This observation indicated that free amino acid content of yeast cells can be increased by the heat-shock process. However, the increase of each individual amino acid was not similar. Pro, Ile, Leu, Phe and His showed higher increases compared to the others. This indicated that even though the protease in yeast cells was also activated by the heat-shock process, the rise in amino acid content due to hydrolysis was not so much and only specific amino acids were released from cell protein.

(received Apr. 13, 1981)

微生物たん白 (SCP) は核酸の含量が高く (約 10%), 人間の食料とするには何らかの方法でその含量を低下させる必要がある。

現在までに、各種の核酸含量の低下法が報告されているが、大きく分けると化学的方法と酵素法に分けられる。化学的方法としては、塩化ナトリウムによる抽出法^{1)~3)}、アルカリによる抽出法^{4)~5)} などがある。いっぽう、酵素法としては RNA 分解酵素により、菌体内の RNA を分解し、低分子のヌクレオチドとして抽出する方法である。この場合、外部から RNA 分解酵素を加える方法⁶⁾ と、菌体内部の酵素を利用する方法がある。後者は、RNA 分解酵素を活性化する方法として、菌体に熱を加えることからヒート・ショック法といわれる。この方法は、操作が簡単であることから、多くの研究者により、その条件、効果等が検討されている^{7)~12)}。

ヒート・ショック法は菌体内の RNA 分解酵素を活性化するのだから、他の酵素も活性化されると思われる。

その際、最も問題となるのはプロテアーゼによるたん白質の加水分解であろう。たん白質が分解されると、栄養価、物性が変化するのみならず、分解によって生成する遊離アミノ酸は、味・フレーバーに大きな影響を与える。そこで、ここでは、*Candida utilis* 菌体をヒート・ショック処理し、そのたん白質の分解の有無を調べた。また、ヒート・ショック処理を、他の研究者の行っている培地中で行わず、水溶液中で行った。この方法によれば、低分子化し、菌体外に溶出したヌクレオチドを水溶液として回収できるからである。

実験方法

供試菌体: *Candida utilis* IFO 0619 をグルコースを炭素源として培養した。培地組成は、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5.0 g, KH_2PO_4 0.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 710 μg , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 670 μg , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 μg , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 μg , イーストエキス 4 g, グルコース 7.6 g を水 1

* 千葉県衛生研究所 (Chiba Institute of Public Health)

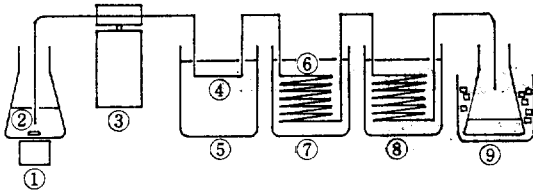


Fig. 1. Apparatus used for heat-shock process

- ① stirrer ② cell suspension ③ pump (60 ml/hr)
 ④ stainless tube (0.7 mm ϕ ×30 cm) ⑤ bath (68°C)
 ⑥ stainless tube (3 mm ϕ ×8.5 m) ⑦ bath (50°C)
 ⑧ bath (55°C) ⑨ reservoir

に溶解して用いた。培養温度は 30°C, 培地の pH は 4.0 とし, 1 分間 200 回のしんとう培養を行った。

ヒート・ショック: 22 時間の培養を行った菌体を遠心分離により集菌した後, 蒸溜水に再けいれし, pH を 7.0 に調整した。ヒート・ショック処理は Fig. 1 に示した装置を用いて行った。処理条件は第 1 ステップ, 68°C, 6 sec, 第 2 ステップ, 50°C, 1 hr, 第 3 ステップ, 55°C, 1 hr とした。

核酸含量の測定: 菌体中の核酸含量は, Schmidt-Thanhauser-Schneider 法を改良した方法^{4,18)} によった。

アミノ酸分析: 菌体中の全アミノ酸の含量は, 6NHCl

で 110°C, 22 時間加水分解した後, アミノ酸分析計 (日立 KLA 3B 型) で測定した。菌体中の遊離アミノ酸含量は, 菌体をホモゲナイザーで破壊した後, 10% TCA 溶液とし, 可溶性画分をアミノ酸分析計で測定した。

結果と考察

1. ヒート・ショック処理による核酸含量の低下

Table 1 にヒート・ショック処理をした菌体の核酸含量を示した。対照に比べ, RNA 画分の減少が著しく, RNA 分解酵素により RNA が分解されたことが示された。全核酸含量は, 対照の 10.24% に対し, 3.65% と約 3 分の 1 に低下させることができた。

2. ヒート・ショック処理が菌体のアミノ酸に及ぼす影響

Table 2 にヒート・ショック処理をした菌体の全アミ

Table 1. Nucleic acid content of yeast cells
(% of dry cells)

Fraction	Control	Heat-shocked
Acid-soluble	0.85	0.53
RNA	8.81	2.65
DNA	0.58	0.47
Total	10.24	3.65

Table 2. Amino acid content of yeast cells

Amino acid	Heat-shocked			Control			A/B
	Free	Total	Free/Total×100 (A)	Free	Total	Free/Total×100 (B)	
Asp	0.437	376	0.116	0.234	307	0.076	1.5
Thr	0.437	228	0.192	0.052	194	0.027	7.1
Ser	0.793	205	0.387	0.202	142	0.142	2.5
Glu	0.464	373	0.124	0.360	332	0.108	1.1
Pro	0.241	192	0.125	0.007	175	0.004	31
Gly	0.282	363	0.078	0.108	326	0.033	2.4
Ala	0.624	347	0.180	0.134	297	0.045	4.0
Val	0.502	324	0.155	0.071	335	0.021	7.4
Met	0.032	24	0.133	0.015	17	0.088	1.5
Ile	0.393	213	0.185	0.032	205	0.016	12
Leu	0.707	272	0.260	0.047	206	0.023	11
Tyr	0.229	102	0.225	0.028	75	0.037	6.1
Phe	0.339	143	0.237	0.025	98	0.026	9.1
Lys	0.725	350	0.207	0.149	210	0.071	2.9
His	0.203	81	0.251	0.016	48	0.033	7.6
Arg	0.511	159	0.321	0.171	106	0.161	2.0
Total	6.919	3,752	0.184	1.816	3,073	0.059	3.1

(μ moles/g of dry cell)

ノ酸と遊離アミノ酸組成を示した。対照の菌体の全アミノ酸量は乾燥重 1g 当り 3,073 μ mole で、遊離アミノ酸は 1.816 μ mole であり、全アミノ酸に対する遊離アミノ酸は 0.059% と非常に少なかった。これに対し、ヒート・ショック処理した菌体の遊離アミノ酸は乾燥重 1g 当り 6.919 μ mole で、全アミノ酸の 0.184% を占めていた。すなわち、ヒート・ショック処理をした菌体の遊離アミノ酸の割合は、対照の 3.1 倍であった。しかし、各アミノ酸ごとに見ると、その増加は一様でなく、プロリン (31 倍)、イソロイシン (12 倍)、ロイシン (11 倍)、フェニルアラニン (9.1 倍)、ヒステジン (7.6 倍) などの増加がいちぢるしく、いっぽう、グルタミン酸 (1.1 倍)、アスパラギン酸 (1.5 倍)、メチオニン (1.5 倍) の増加はわずかであった。このことは、ヒート・ショック処理により酵母菌体中のプロテアーゼ活性も増加するが、その作用はわずかで、プロテアーゼの基質特異性に合ったアミノ酸が、選択的に遊離していると考えられた。

要 約

(1) *Candida utilis* 菌体を水溶液中でヒート・ショック処理することにより、その核酸含量を 3.65% (乾燥重) に低下できた。

(2) ヒート・ショック処理により菌体中の遊離アミノ酸含量は 3.1 倍に増加した。

(3) ヒート・ショック処理によるプロテアーゼ活性の

増加はわずかであり、基質特異性にあったアミノ酸のみが選択的に遊離した。

文 献

- 1) HEDENSKOG, G. and EBBINGHAUS, L.: *Biotech. Bioeng.*, **14**, 447 (1972).
- 2) HEDENSKOG, G. and MOGREN, H.: *Biotech. Bioeng.*, **15**, 129 (1973).
- 3) TREVELYAN, W. E.: *J. Sci. Food Agric.*, **27**, 225 (1976).
- 4) TAJIMA, M. and YOSHIKAWA, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 611 (1975).
- 5) VANANUVAT, P. and KINSELLA, J. E.: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 216 (1975).
- 6) CASTRO, A. C., SINSKEY, A. J. and TANNENBAUM, S. R.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 422 (1971).
- 7) MAUL, S. B., SINSKEY, A. J. and TANNENBAUM, S. R.: *Nature*, **228**, 181 (1970).
- 8) OHTA, S., MAUL, S., SINSKEY, A. J. and TANNENBAUM, S. R.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 415 (1971).
- 9) 芝崎 勲, 安川照雄, 浅田祥司: 日食工誌, **21**, 545 (1974).
- 10) ZEE, J. A. and SIMARD, R. E.: *Appl. Microbiol.*, **29**, 59 (1975).
- 11) TREVELYAN, W. E.: *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 141 (1978).
- 12) TREVELYAN, W. E.: *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 903 (1978).
- 13) 農林水産技術会議: 食品分析研究会報告書, p. 233 (1975).