

耐塩性酵母Zygosaccharomyces rouxii SR-2株のプロトプラスト化および再生条件の検討

誌名	香川県発酵食品試験場報告
ISSN	03685640
著者	末澤, 保彦 日野, 明寛 高野, 博幸
巻/号	80号
掲載ページ	p. 16-18
発行年月	1988年9月

耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-2 株 のプロトプラスト化および再生条件の検討

末澤保彦, 日野明寛*, 高野博幸*

Some conditions for protoplast preparation and regeneration of
protoplasts of salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii* SR-2

Yasuhiko SUEZAWA, Akihiro HINO
and Hiroyuki TAKANO

About all of the cells of *Zygosaccharomyces rouxii* SR-2 became protoplasts by digesting them with 0.5 mg/ml (10 unit/ml) Zymolyase 20T in 1.0 or 1.5M sorbitol. Regeneration rate from protoplasts to normal cells increased from about 1% to above 10% by increasing sorbitol concentration from 1.0 to 1.5 M, and that in potassium phosphate buffer was higher than in Tris-HCl buffer. When the cells had been treated with 0.5 mg/ml Zymolyase 20T in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.5 M sorbitol at 30°C for 60 minutes, the regeneration rate increased to about 28%.

緒 言

バイオテクノロジーの一つとして細胞融合による育種・改良が研究されており, 当試験場においてもその技術を使用し, 耐塩性酵母 *Z.rouxii* SR-2 株のアルコール生成能を高めることを検討している。前報¹⁾において SR-2 株のプロトプラスト化条件について検討を行ない, ほぼプロトプラスト化率はほぼ 100% に達したが再生率は約 1% にしかなかった。そこで今回は再生率をあげるために更に検討を行なったので, ここに報告する。

実 験 報 告

1. 培養方法

菌体は 100 ml の Y P G 培地 (グルコース 4%, ペプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%) の入った 500 ml 容坂口フラスコ中で, 往復振とう培養 (30°C, 120 rpm) した。実験には, 対数増殖期中期から後期の菌体を 3 回滅菌水で洗浄して使用した。

2. プロトプラスト化条件

今回は, 細胞壁溶解酵素として Zymolyase 20T (生化学工業, 20 unit/mg) を使用した。酵素を溶解後, 0.45 または 0.20 μm メンブランフィルターで濾過滅菌したも

のを 0.05~0.5% / ml になるように添加した。浸透圧調節剤は KCI とソルビトールを使用し, 1.0~1.5M の範囲で検討した。さらに緩衝液の種類と濃度および pH についても若干検討した。プロトプラスト化は反応液 (約 10^8 cells/ml) 5~6 ml を L 字管に入れて大洋工業製モノ振とうインキュベーター中で 30°C, 1 時間反応を行なわせた。

3. プロトプラスト化率および再生率の測定

プロトプラスト化率と再生率は, 反応液を浸透圧調節剤で希釈後, 各濃度のソルビトールの入った再生用 Y P G 寒天培地 (寒天濃度は 3%) で再生したコロニー数より求めた。

結果および考察

1. 浸透圧調節剤の影響

Z.rouxii SR-2 株の KCI およびソルビトールによるプロトプラスト化率に大きな違いは認められなかった (99% 以上)。しかし, KCI 使用では, ソルビトールを使用した時よりも反応中に菌体の凝集が観察され, 均一に懸濁し難かった。このことから, SR-2 のプロトプラスト化には浸透圧調節剤としてソルビトールを使用することとした。

2. プロトプラスト化率と再生率への影響

1) Zymolyase 20T 濃度とソルビトール濃度

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-2, Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305

Zymolyase 20T濃度とソルビトール濃度がプロトプラスト化率と再生率に及ぼす影響について検討した結果を表1に示した。プロトプラスト化率は酵素濃度(0.05~0.5 mg/ml)およびソルビトール濃度(1.0~1.5 M)の範囲であれば、濃度による影響をさほど受けず、99%以上がプロトプラスト化する。一方、再生率はソルビトール濃度が高いほど良くなること、特に、ソルビトール濃度を1.5 M、Zymolyase 20T濃度を0.5 mg/mlにすることにより、約10%の再生率が得られることがわかった。以後の実験では、再生率がこのうちで一番良かったので、Zymolyase 20Tの濃度を0.5 mg/ml(10unit/ml)で行なった。

表1 Zymolyase 20T濃度とソルビトール濃度によるプロトプラスト化率と再生率*1

Zymolyase 20T (mg/ml)	ソルビトール (M)	プロトプラ スト化率*2 (%)	再生率*2 (%)
0.05	1.0	99.8	0.5
	1.2	99.7	3.2
	1.5	99.7	7.8
0.1	1.0	99.9	1.0
	1.2	99.9	2.9
	1.5	99.2	4.6
0.5	1.0	99.7	2.3
	1.2	99.6	5.6
	1.5	99.4	10.8

- *1 緩衝液は50mM Tris-HCl(pH7.5)を使用した。
 *2 プロトプラスト化率と再生率は以下の式より求めた。
 $\text{プロトプラスト化率} = (C - A) \times 100 / C$
 $\text{再生率} = (B - A) \times 100 / (C - A)$
 A: YPG寒天培地塗抹生育コロニー数
 (非プロトプラストのみ生育)
 B: 浸透圧調節剤入りYPG寒天培地重層生育コロニー数
 (プロトプラストの一部と非プロトプラストが生育)
 C: ブランク(Zymolyase無添加)のYPG寒天培地生育コロニー数

2) 緩衝液のpHとソルビトール濃度

緩衝液のpHとソルビトール濃度がプロトプラスト化率と再生率に及ぼす影響について検討した結果を表2に示した。プロトプラスト化率は、pH(pH 5.5~7.0)やソルビトール濃度(1.0および1.5 M)による影響を殆ど受けない。再生率はpH6.0が最も良く、ソルビトール濃度の影響を強く受け、1.5Mソルビトールの使用で1.0 Mソルビトール使用時よりも約10倍(約20%)の再生率が得られることがわかった。

表2 リン酸カリウム緩衝液のpH*1とソルビトール濃度におけるプロトプラスト化率と再生率*2

ソルビトール (M)	pH	プロトプラ スト化率 (%)	再生率 (%)
1.0	5.5	99.9	0.8
	6.0	99.9	1.5
	6.5	99.9	2.2
	7.0	100	2.5
1.5	5.5	99.8	23.1
	6.0	99.9	26.9
	6.5	100	21.1
	7.0	100	23.1

- *1 緩衝液は83mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ で調製した。
 *2 Zymolyase 20T濃度は0.5 mg/ml(10unit/ml)

3) 緩衝液の種類

表1と表2の結果からTris-HCl緩衝液とリン酸カリウム緩衝液とでは再生率に違いが認められたため、緩衝液の濃度とpH条件を同一としプロトプラスト化率と再生率について検討し、その結果を表3に示した。両緩衝液の濃度による影響はプロトプラスト化率には認められなかったが、再生率はTris-HCl緩衝液を使用した時(5.6~6.1%)に比べてリン酸カリウム緩衝液を使用した時(12.4~15.9%)の方が2倍以上高くなることがわかった。

表3 50mM緩衝液*1におけるプロトプラスト化率と再生率*2

緩衝液	Zymolyase 20T (mg/ml)	プロトプラ スト化率 (%)	再生率 (%)
Tris-HCl	0.5	99.8	6.1
	"	99.8	5.9
リン酸 カリウム	0.5	99.9	15.9
	"	99.7	12.4

- *1 pHは7.5
 *2 ソルビトール濃度は1.5M

次に、緩衝液の種類と濃度がプロトプラスト化率および再生率に及ぼす影響について検討し、その結果を表4に示した。再生率はかなりの差がみられた。再生率は、リン酸カリウム緩衝液の濃度が高くなるに従わずかではあるが高くなる傾向がみられ、またpH7.5にくらべてpH6.0の方が高くなることがわかった。リン酸カリウム緩衝液では、ソルビトール濃度が再生率に多大な影響を及ぼしており、1 Mソルビトールでは再生率が10%以下であったのに対し、1.5Mソルビトールでは16%以上となった。一方、Tris-HCl緩衝液でもほぼ同様となった。このことから再生率を上げるためには1.5Mソルビトールを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH6.0)がよいと思われた。今回は、緩衝液2種類についてのみ検討を行

なったがより多くの種類を検討する必要があるのかもしれない。

一般に、酵母のプロトプラスト化は浸透圧調節剤として0.6~1.0 MのKClまたはソルビトールが、緩衝液はpH 6.0~7.5のものが用いられている^{2),3)}。また、*Z.rouxii*のプロトプラスト化を行なう場合の浸透圧調節剤としては、1 Mソルビトールを含んだ、pH 6.0⁴⁾または0.8 Mソルビトールを含んだ、pH 7.5⁵⁾、1 M KClを含んだ、pH 7.5⁶⁾または2 M KClを含んだ、pH 6.8⁷⁾等で行なわれている。今回の結果はソルビトールを使用した例では、従来の結果よりもソルビトールの濃度が高い値になった。これは単に株の違いかもしれないが、耐塩性酵母の浸透圧が高いためと思われる。実際に細胞融合のためにプロトプラスト化をする場合には、相手の酵母の条件にも対応させていかなければならないので、一部の条件変更をしなければならぬかもしれない。

表4 緩衝液のpH、濃度およびソルビトール濃度におけるプロトプラスト化率と再生率^{*1,2}

ソルビトール (M)	緩衝液 種類	pH	プロトプラスト 化率(%)	再生率 (%)	
1.0	リン酸 カリウム	7.5	0.05	100	3.1
			0.10	100	4.5
			0.15	100	5.1
		6.0	0.10	100	8.1
	Tris-HCl	7.5	0.10	100	1.6
1.5	リン酸 カリウム	7.5	0.05	100	16.8
			0.10	100	17.9
			0.15	100	18.9
		6.0	0.10	99.7	28.2
Tris-HCl	7.5	0.10	100	21.0	

* 1 再生は1.5 Mソルビトール入りYPG寒天培地に重層した。

* 2 Zymolyase 20T濃度は0.5 mg/ml (10unit/ml)

要 約

Z.rouxii SR-2株の再生率の向上を目的としてプロトプラスト化条件の検討を行ない、以下の結果を得た。

- 1) 浸透圧調節剤としてソルビトールのほうがKClに比べて菌体の凝集が少なかった。
- 2) Zymolyase 20T濃度は0.5 mg/ml (10unit/ml)で良好な結果が得られた。
- 3) 再生率は1 Mソルビトールに比べて1.5Mの方が数倍高くなり、再生率としても10%以上となった。
- 4) Tris-HCl緩衝液とリン酸カリウム緩衝液とでは、リン酸カリウム緩衝液の方が高い再生率(20%以上)が得

られ、0.1M、pH 6.0の条件がよいと思われた。

5) 以上の結果から、*Z.rouxii* SR-2のプロトプラスト化条件は、30℃、60分間0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)を含む1.5Mソルビトール中、Zymolyase 20T濃度0.5 mg/mlの処理でよいことがわかった。

文 献

- 1) 末澤保彦：香川発食試報，79，7 (1987)。
- 2) 有馬賢治，高野勇：醸工，57，380 (1979)。
- 3) 郡家徳郎：醸協，79，210 (1984)。
- 4) 榎倉辰六郎 編著：醤油の科学と技術，日本醸造協会，P 215 (1988)。
- 5) 高橋慎吉，近藤道子：共立女子大学家政学部紀要，30，13 (1984)。
- 6) 近藤君夫，蟻川幸彦，桑原秀明，馬場茂，宮崎忠雄：長野食工試報，14，81 (1986)。
- 7) Wilfred N. arnord and Robert G. garrison: *J. Bacteriology*, 137, 1386 (1979)。