

## 醤油中の耐塩性酵母の増殖促進物質に関する研究 (第4報)

### ミオイノシトール欠乏の *Zygosaccharomyces rouxii* の増殖に対する影響

加藤 熙

前報<sup>1)</sup>において、耐塩性酵母に対する溜醤油の増殖促進効果がミオイノシトールに起因することを報告した。耐塩性酵母のミオイノシトール要求性は、OHNISHI H<sup>2)</sup>、佐藤ら<sup>3), 4)</sup>の報告があるが、ミオイノシトールの役割については、明確な結論は得られていない。非耐塩性ミオイノシトール要求性酵母の *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) について、グルコース 6 磷酸からミオイノシトール磷酸やミオイノシトールを合成する酵素系がないこと<sup>5)</sup>、磷脂質やグルカン合成に関与すること<sup>6), 7)</sup>などが報告されている。

*Zygosaccharomyces rouxii* (*Z.rouxii*) の増殖に対するミオイノシトールの役割を明らかにするため、菌体増殖と食塩濃度及びミオイノシトール添加量との関係、ミオイノシトールの菌体への取り込み、ミオイノシトール欠乏培地での細胞の形態などについて検討したので、これらの結果について報告する。

#### 実験方法

##### 1. 培地の調製と培養条件

ミオイノシトールを除く組成の基本培地<sup>1)</sup>を2倍濃度で調製し、この50mlに対し、ミオイノシトール溶液(100mg/100ml)を0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mlずつ添加、これらに食塩を0, 5, 10, 15, 20g宛添加して、各々100mlに定容した。従って、食塩濃度0, 5, 10, 15, 20%の5段階に対し、ミオイノシトールを0, 2, 5, 10, 20, 50mg/ℓ添加した組合せになる。各培地は5mlずつ試験管に分注し、また60mlずつ100ml三角フラスコに分注し、115℃, 10分間加熱殺菌した。

*Z.rouxii* は、食塩5%, ミオイノシトール2mg/ℓの培地で30℃ 2日間前培養し、菌体を遠心分離、滅菌した5%食塩水で3回洗浄した後、10<sup>3</sup>/ml以下のレベルになるように試験培地に接種し、30℃, 7日間または15日間培養し、経時的に菌体量などの測定に供した。

##### 2. 菌体増殖度および生菌数の測定

菌体増殖度(以下、増殖度)は、培養液を攪はんして菌体を分散させた後、5倍に希釈して660nmにおける吸光度を測定した。

菌体重量は、培養液50mlを3,000rpm 5分間遠心分離し、得られた菌体を蒸留水で3回洗浄した後、80℃で恒量になるまで乾燥して秤量した。

生菌数は、基本培地に寒天を加えた組成の培地で、希釈平板培養法によるコロニー数を計測し、1ml当りの生菌数を算出した。

##### 3. ミオイノシトールの定量

培養液は、3,000rpm, 10分間遠心分離して菌体を除去した後、Dowex50 X-16, Dowex50 X-1, およびAmberlite IRA410の3カラムを連続的に通液し、流出液をロータリーエバポレーターによって減圧乾固した。

また、培養後の菌体は、CHARALAMPOUSら<sup>8)</sup>の方法に準じて加水分解した。即ち、洗浄乾燥菌体約50mgを試験管に精秤し、6N塩酸溶液5mlを加えて熔融封緘、115℃, 6時間加熱分解した後、減圧乾固して塩酸を除去し、蒸留水で10mlに定容した。

培養液および菌体の加水分解物は、トリメチルシリル誘導体を調製<sup>9)</sup>して、株式会社津製作所製GC3A型ガスクロマト装置でNeopentylglycol succinate polyesterカラムによって常法どおり分析した。また、乾固した培養液および菌体の加水分解物は、蒸留水で溶解希釈した後、バイオアッセイ<sup>10)</sup>によってミオイノシトールの定量分析を行った。即ち、第1表の組成の培地で、ミオイノシトール濃度を0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0mg/ℓとし、*Saccharomyces carlsbergensis* 4228を接種、30℃, 5日間培養後の660nmにおける吸光度を測定して検量線とした。試料液は適宜希釈して培地に添加、標準ミオイノシトール液と同様に測定し、検量線と希釈率とから試料中のミオイノシトール含量を算出した。

##### 4. 顕微鏡写真

食塩0, 5%およびミオイノシトール0, 20mg/ℓで培養した*Z.rouxii*について、オリンパス光学株式会社製BH S323型生物顕微鏡(PM-10M写真装置)を用い

て検鏡した。

第1表 ミオイノシトールバイオアッセイ用の培地組成 (1ℓ)

グルコース	50g
塩類溶液 (A,B,C)	各 25ml
クエン酸緩衝液	50ml
カゼイン加水分解物	40ml
チアミン塩酸塩	1mg
ビオチン	10γ
パントテン酸カルシウム	1mg
ナイアシン	1mg
ピリドキシン塩酸塩	1mg

塩類溶液 A.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  25g/500ml 水溶液  
 B.  $\text{MgSO}_4$  10g,  $\text{NaCl}$  0.5g,  $\text{FeSO}_4$  0.5g,  $\text{MnSO}_4$  0.5g/500ml 水溶液  
 C.  $\text{MgSO}_4$  40g,  $\text{NaCl}$  2g,  $\text{FeSO}_4$  2g,  $\text{MnSO}_4$  8g/500ml 水溶液

実験結果および考察

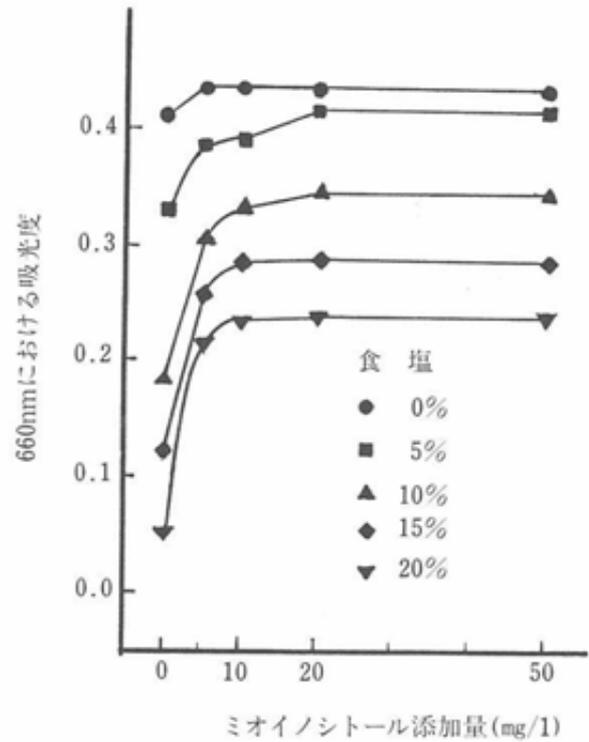
1. 増殖度に対する食塩およびミオイノシトール濃度の影響

醤油酵母は、高濃度食塩下において、含硫アミノ酸、ミオイノシトールならびにコリンに対する要求性が強化される<sup>1)</sup>ので、*Z.rouxii*のミオイノシトール要求性について食塩濃度との関係を検討した。

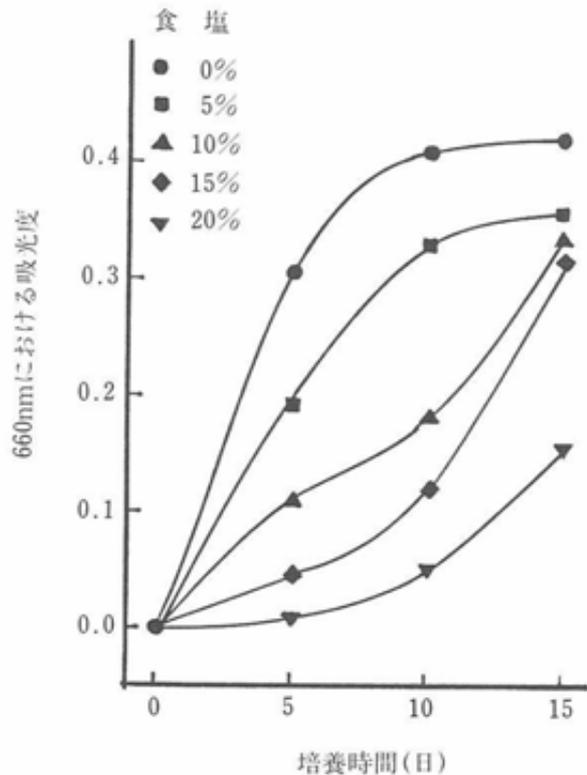
食塩濃度を0, 5, 10, 15, 20%とし、ミオイノシトール添加量を0, 5, 10, 20, 50mg/ℓとした各培地における本菌の増殖度を経時的に測定した。その結果、食塩濃度によって増殖度に差は認められたが、ミオイノシトール添加培地では5日または10日後に増殖度は最大となった。

第1図に、30℃, 10日間培養後の増殖度を示す。食塩濃度0%の場合、ミオイノシトール添加区はすべて最大増殖度を示し、ミオイノシトール欠乏でもほぼ同じ値となった。食塩5%では、10mg/ℓ以下の添加では食塩0%よりやや低かったが、20mg/ℓ以上の添加では食塩0%とほぼ同じ値となった。食塩10%以上では、食塩濃度の増加とともに低下し、ミオイノシトール添加区の食塩20%での増殖度は、食塩0%の約1/2となった。ミオイノシトール欠乏では、とくに食塩10%以上の濃度で増殖度が著しく低下した。

また、ミオイノシトール添加区の培養15日後の増殖度は、食塩0, 5%では、10日後とはほぼ同じレベルにあったが、食塩10, 15%では10日後よりも増殖度が増加し、食塩5%の約4/5の値となった。食塩20%では増殖は抑制され、食塩5%の約1/2のレベルとなった。



第1図 食塩およびミオイノシトール濃度の影響 30℃, 10日間培養



第2図 ミオイノシトール欠乏での増殖度と食塩濃度 30℃, 15日間培養 ミオイノシトール添加量(0mg/ℓ)

次に、ミオイノシトール欠乏培地における増殖度の経時変化を第2図に示す。*Neurospora crassa* はミオイノシトール磷脂質が豊富で、ミオイノシトール欠乏でプロテアーゼが遊離するため、サイトプラズマのオートリシスを生じて死滅する<sup>11)</sup>が、*Z.rouxii*は、ミオイノシトール欠乏でも増殖し、食塩0%ではミオイノシトール添加区と増殖速度は変わらず、最大増殖度もほぼ同じレベルとなった。

食塩5%では、ミオイノシトール添加区に比べて増殖度がやや低くなり、ミオイノシトール添加の効果が明確となった。食塩10%以上では増殖度が大きく抑制され、10日後には食塩0%の1/2から1/10に低下するが、食塩10%と15%では15日後に食塩5%とほぼ同じレベルまで増加した。食塩20%の場合には、さらに増殖度が抑制され、15日後にも食塩5%の1/2以下の値となった。以上のように、食塩存在下において、とくにミオイノシトールの要求性が大きくなることが確認できた。

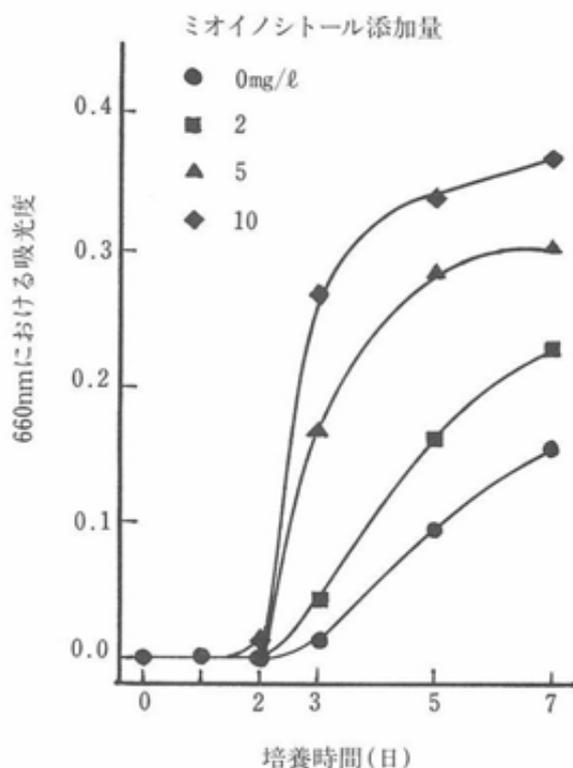
## 2. 増殖度およびミオイノシトール濃度の経時変化

食塩5%でミオイノシトール添加量を0, 2, 5, 10mg/lの4段階とし、30℃, 7日間培養して、増殖度、生菌数、菌体重量(培養液50ml当り)、培養液のミオイノシトール含量を経時的に測定した。

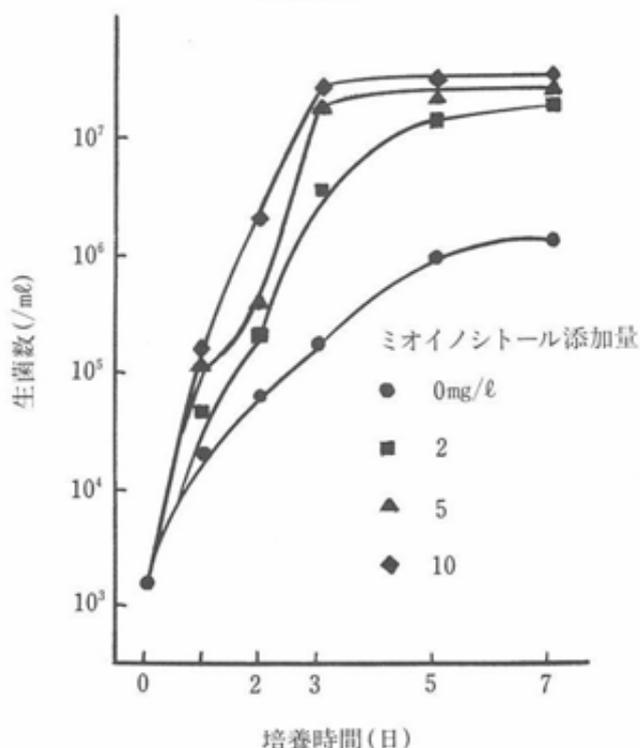
増殖度の経時変化を第3図に示す。ミオイノシトール添加量が5mg/l以上では3日後でかなり大きな増殖度となり、10mg/l添加では7日後に最大増殖度となった。2mg/lでは3日後の増殖度は小さく、7日後でも10mg/lの場合の約1/2の値であった。ミオイノシトール欠乏でも5日後以降で明確な増殖が認められ、2mg/lの約2/3の値となった。

生菌数は、第4図に示すように、ミオイノシトール5, 10mg/l添加培地では3日後まではほぼ対数的に増加して最大値となった。ミオイノシトール2mg/lと欠乏の場合は、2日以降の増加度が低下し、5日後の生菌数はミオイノシトール5mg/l以上添加の場合の1/10以下のレベルとなった。ミオイノシトール2mg/lの場合は7日後に5mg/lとほぼ同じレベルまで増加したが、ミオイノシトール欠乏の場合は5日後と変わらなかった。生菌数がほぼ同じレベルに保持されたにもかかわらず、ミオイノシトール添加量の増加とともに増殖度は増加した(第3図)。これはミオイノシトール添加量によって、本菌の細胞成分の充実度に差を生じたためと考えられた。

各培養液を50mlずつ採取し、3,000rpmで遠心分離、

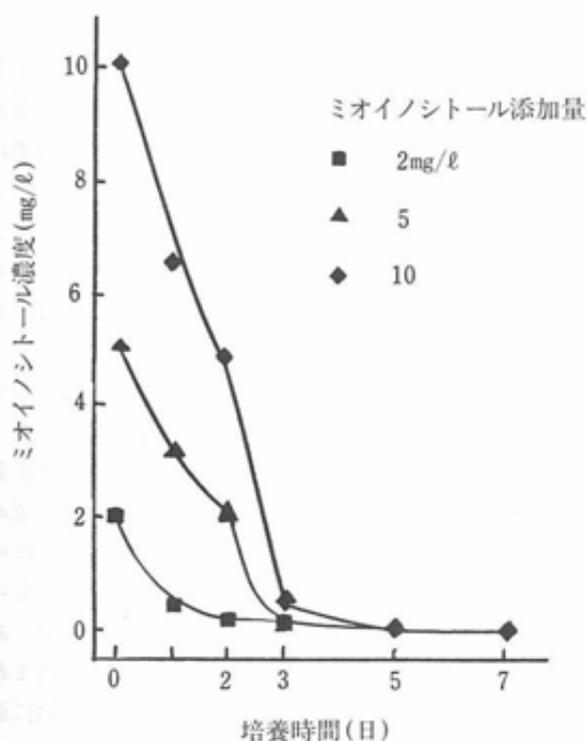


第3図 ミオイノシトール濃度の増殖度への影響  
30℃, 7日間培養  
食塩濃度5%



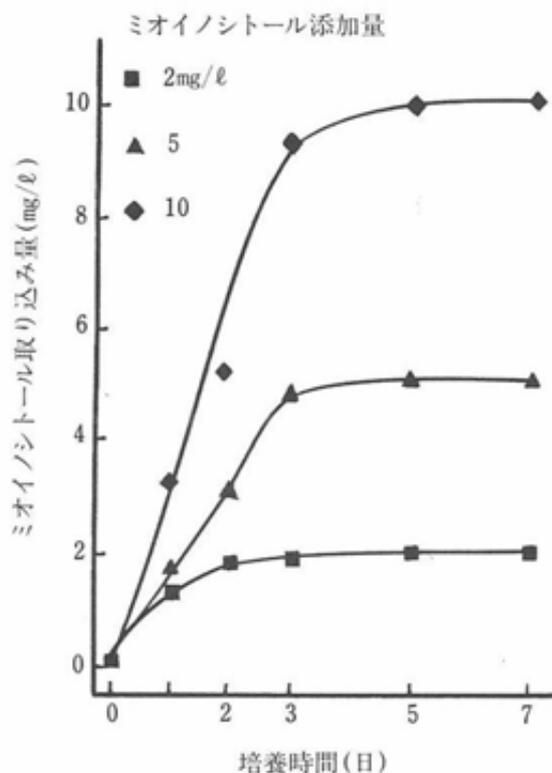
第4図 ミオイノシトール濃度の生菌数への影響  
30℃, 7日間培養  
食塩濃度5%

上清についてミオイノシトールを定量した。第5図は培養液上清のミオイノシトール濃度の経時変化である。10mg/ℓまでの添加量では、培養後3日までに大きく減少し、2mgおよび5mg/ℓ添加の場合は3日後にミオイノシトールが0となり、10mg/ℓ添加の場合は5日後にほぼ0となった。この実験結果から、培地から菌体へ移行したミオイノシトール量を算出した結果が第6図で、第7図はミオイノシトールの菌体への取り込み量を生菌数変化(第4図)と対比したものである。

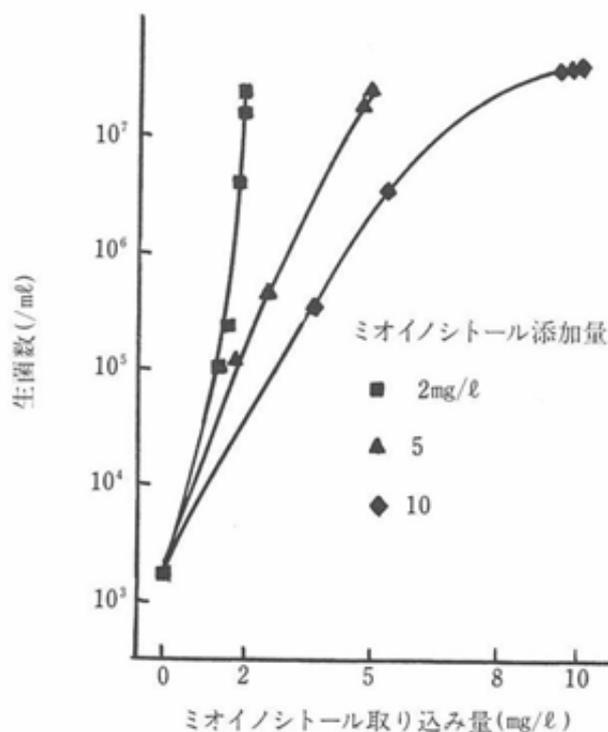


第5図 ミオイノシトール濃度の経時的変化  
30℃, 7日間培養  
食塩濃度5%

本菌の生菌数が $10^6 \sim 10^7$ /ml以下のレベルではミオイノシトールの取り込み量が5mg/ℓ程度となり、この濃度までは、第7図のように、ミオイノシトールの取り込み量に対して、生菌数がほぼ対数関数的に増加することが確認された。ミオイノシトール濃度が高くなるに従って、生菌数当りの取り込み量が大きくなるが、これは取り込まれたミオイノシトールが生菌数増加とともに菌体成分の充実に用いられるため(第3図のように同レベルの生菌数でも吸光度が大となる)か、取り込みの方が菌体内で併行して行われる合成よりも優先されるためのいずれかであろうと考えられる。



第6図 ミオイノシトール取り込み量の経時変化  
30℃, 7日間培養  
食塩濃度5%



第7図 ミオイノシトール取り込み量と生菌数  
30℃, 7日間培養  
食塩濃度5%

### 3. 菌体のミオイノシトール含量と培養条件

食塩0.5%でミオイノシトール濃度を0.20mg/ℓとし、30℃、7日間培養後の菌体重量と菌体内のミオイノシトール含量との関係を第2表に示す。

ミオイノシトール欠乏培地での菌体重量は、食塩0%ではミオイノシトール添加培地の約60%であったが、食塩5%添加では40%以下に大きく低下した。食塩5%でもミオイノシトールを添加した培地では食塩0%の培地での菌体重量とほぼ同じであった。菌体重量1mg当りのミオイノシトール含量は、食塩0%ではミオイノシトール欠乏でも添加培地とほぼ同じであったが、食塩5%の場合には、ミオイノシトール含量は約70%となった。

*Z.rouxii* は培地からのミオイノシトールの取り込みと併行して菌体内でミオイノシトールを合成することが確認できたが、合成能は食塩によってかなり大きな阻害を受けるものと考えられた。

第2表 菌体内のミオイノシトール含量

培地*1 ミオイノシトール	食塩	増殖量*2 菌体重量mg	ミオイノシトール含量*3 γ/mg
0mg/ℓ	0%	101.5	1.60
	5	68.6	1.13
20	0	168.1	1.62
	5	161.6	1.49

\*1 80ml

\*2 30℃ 7日間培養後

\*3 菌体重量1mg中の含量

### 4. 顕微鏡による観察

前項での培養後の菌体を顕微鏡で観察した結果を写真1から写真6に示す。ミオイノシトール添加培地では、写真1(食塩0%)、写真2(食塩5%)のように娘細胞の分離は正常に行われているが、ミオイノシトール欠乏培地では、食塩の有無にかかわらず、細胞の形態に異常が認められた。

GHOSHら<sup>12)</sup>は、*S.carlsbergensis* がミオイノシトール欠乏において凝集 (cell aggregate) を生じると報告し、HAYASHIら<sup>13)</sup>は中性脂質の蓄積を報告している。また、CHALLINORら<sup>14)</sup>は、*S.cerevisiae* がミオイノシトール欠乏において cell clump または aggregates を形成し、細胞壁中のミオイノシトール含量が低下 (細胞壁脂質のホスホイノシタイド量が正常

で1.1%、ミオイノシトール欠乏で0.5%)すると報告、DOHIらは*S.cerevisiae*、*Schizosacch.pombe*について同様の報告<sup>15)・16)</sup>をしている。更に、谷ら<sup>17)</sup>は、乳酸添加培地で清酒酵母が凝集し、phosphatidylinositol 含量が約50%となった<sup>18)</sup>と報告している。

*Z.rouxii* の場合も、これらの結果と同じように、ミオイノシトール欠乏培地で凝集 (写真3、写真4) したことが確認された。また、写真5及び写真6のように、親細胞から出芽した娘細胞が分離しないうちに次の出芽が生じ、3ないし5個の細胞が連結した状態になったものも観察された。

ARIMA<sup>19)</sup>は、*S.cerevisiae* がミオイノシトール欠乏で unbalanced growth を生じて生菌数が減少するので、ミオイノシトールが細胞の構造だけでなく機能にも必要であると報告、RIDGEWAYら<sup>20)</sup>はミオイノシトール欠乏で細胞質顆粒の構造強度が影響を受け、nucleotide、cytochromes 分解酵素が活発になって、エネルギー代謝が低下して死滅すると推定している。また、HENRYら<sup>21)</sup>は、*S.cerevisiae* の細胞内カリウム濃度やATPレベルの低下により死に至ると報告している。

*Z.rouxii* の場合、ミオイノシトール欠乏培地で生菌数の減少は認められなかったが、clumpと凝集が認められた。本菌が細胞の状態に大きな変化を生じたのは、増殖に伴ってミオイノシトールを合成するものの、正常な細胞分化に必要な量が充足されないか、あるいは菌体内で合成されるものと培地から取り込まれるミオイノシトールとで菌体における生理的役割に違いがあるため、のいずれかによるものと考えられる。

### 要 約

*Zygosaccharomyces rouxii* (*Z.rouxii*) の増殖と食塩濃度およびミオイノシトール添加量との関係、ミオイノシトールの菌体への取り込み、ミオイノシトール欠乏培地での細胞の形態などについて検討した結果、

1) 本菌は、食塩濃度の増加とともに増殖度が低下し、ミオイノシトール添加区の食塩20%での増殖度は、食塩0%の約1/2となった。また、ミオイノシトール欠乏では増殖度が著しく低下し、食塩10%以上の濃度でミオイノシトール添加の効果が大きいことが確認された。

2) 生菌数の経時変化は、ミオイノシトール添加培地では3日後まではほぼ対数的に増加して最大値となった。

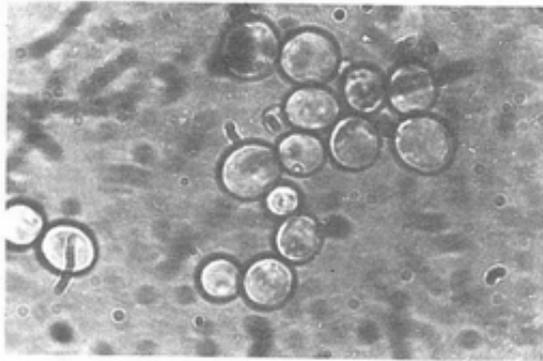


写真1 正常細胞の顕微鏡写真  
食塩0%, ミオイノシトール20mg/ℓ

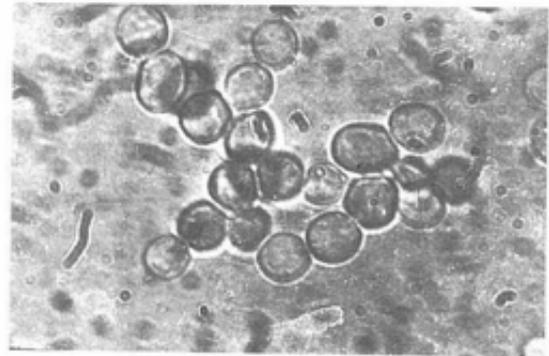


写真4 clump  
食塩0%, ミオイノシトール0mg/ℓ

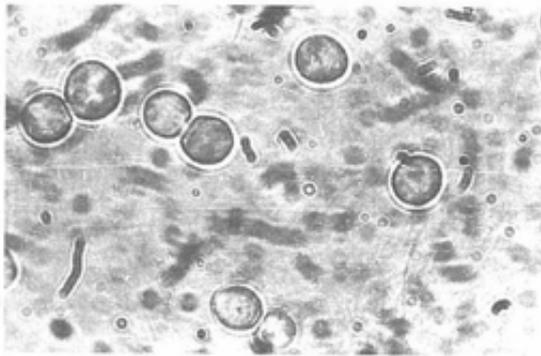


写真2 正常細胞の顕微鏡写真  
食塩5%, ミオイノシトール20mg/ℓ

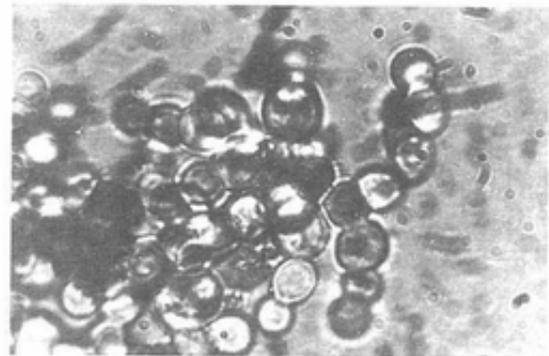


写真5 凝集 (aggregate)  
食塩5%, ミオイノシトール0mg/ℓ

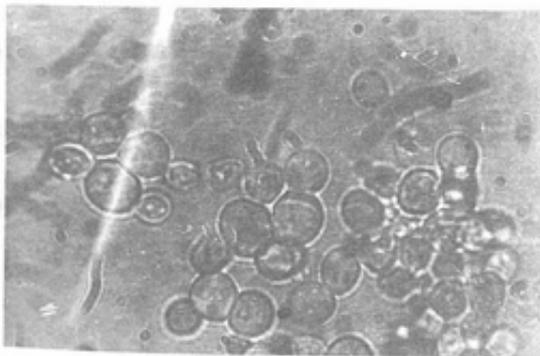


写真3 凝集 (aggregate)  
食塩0%, ミオイノシトール0mg/ℓ



写真6 clump  
食塩5%, ミオイノシトール0mg/ℓ

しかし、ミオイノシトール 2 mg/ℓ と欠乏の場合は、2 日以降の増加度が低下し、5 日後の生菌数はミオイノシトール 5 mg 以上添加の 1/10 以下のレベルとなった。また、生菌数がほぼ同じレベルに保持されたにもかかわらず、ミオイノシトール添加量の増加とともに増殖度は増加したが、これはミオイノシトール添加量によって、本菌の細胞成分の充実度に差を生じたためと考えられた。

3) 培養液のミオイノシトール濃度は、培養後 3 日までに大きく減少し、3 日または 5 日後にほぼ 0 となった。ミオイノシトール濃度が高くなるに従って、生菌数当りの取り込み量が大きくなるが、これは取り込まれたミオイノシトールが菌数増加とともに菌体成分の充実にも用いられるためか、あるいは、取り込みの方が菌体内で併行して行われる合成よりも優先されるためのいずれかであろうと考えられる。

4) ミオイノシトール欠乏培地での増殖度は、食塩 0% ではミオイノシトール添加培地の約 60% であったが、食塩 5% 添加では 40% 以下に大きく低下した。菌体重量 1 mg 当りのミオイノシトール含量は、食塩 0% ではミオイノシトール欠乏でも添加培地でのものとほぼ同じであったが、食塩 5% の場合には、ミオイノシトール含量は約 70% となった。以上のことから、培地からのミオイノシトールの取り込みと併行して菌体内で合成することが確認できたが、合成能は食塩によってかなり大きな阻害を受けるものと考えられた。また、検鏡の結果、ミオイノシトール欠乏培地では、凝集を生じ、3 ないし 5 個の細胞が連結した状態になったものも観察された。

#### 文 献

- 1) 加藤 熙, 好井久雄, 並木満夫: 愛知食品工技年報, 34, 14-21 (1993)
- 2) OHNISHI H: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 151-156 (1957)
- 3) 佐藤正弘, 山田一弥, 植村定治郎: 農化, 30, 492-496 (1956)
- 4) 佐藤正弘, 植村定治郎: 同上, 32, 79-82 (1958)
- 5) CULBERTSON M R, DONAHUE T F, HENRY SA: *J. Bacteriol.*, 126, 243-250 (1976)
- 6) HANSEN B A, LESTER R L: *ibid.*, 142, 79-89 (1980)
- 7) HANSEN B A, LESTER R L: *ibid.*, 151, 334-342 (1982)
- 8) CHARALAMPOUS F C, ABRAHAMS P: *J. Biol. Chem.*, 225, 575-583 (1957)
- 9) ROBERTS R N, JOHNSON J A, FUHR B W: *Anal. Biochem.*, 10, 282-289 (1965)
- 10) TATUM E L, RITCHEY M G, COWDRY E V, WICKS L F: *J. Biol. Chem.*, 163, 675-682 (1946)
- 11) MATILE P: *Science*, 151, 86-88 (1966)
- 12) GHOSH A, CHARALAMPOUS F C, SIMON Y, BORER R: *J. Biol. Chem.*, 235, 2522-2528 (1960)
- 13) HAYASHI E, HASEGAWA R, TOMITA T: *ibid.*, 251, 5739-5769 (1976)
- 14) CHALLINOR S W, POWER D M, TONGE R J: *Nature*, 203, 250-251 (1964)
- 15) DOHI M, TAMURA G, ARIMA K: *Agr. Biol. Chem.*, 35, 1503-1516 (1971)
- 16) DOHI M, TAMURA G, ARIMA K: *ibid.*, 37, 703-710 (1973)
- 17) 谷 喜雄, 下出光男, 角野一成, 福井三郎: 醸工, 41, 445-450 (1963)
- 18) 大森五十士, 角野一成, 谷 喜雄, 福井三郎: 同上, 46, 92-98 (1968)
- 19) ARIMA K, DOHI M, TAMURA G: *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1-15 (1970)
- 20) RIDGEWAY G J, DOUGLAS H C: *J. Bacteriol.*, 75, 88-89 (1957)
- 21) HENRY S A, ATKINSON K D, KOLAT A I, CULBERTSON M R: *ibid.*, 130, 472-484 (1977)