

## 海洋酵母の利用に関する研究— II \*

海洋酵母の甲殻類及び斧足類による分解

島谷 周・金沢 昭夫・柏田 研 —\*\*

Studies on the Utilization of Marine Yeast — II  
Lysis of Marine Yeast by Some *Crustacean* and *Pelecypoda*

Makoto SHIMAYA, Akio KANAZAWA and Ken-ichi KASHIWADA

### Abstract

In the previous paper, we have reported that some marine yeast can be used as useful feed for *Branchiopoda*.

In the present investigation, we studied on the optimum pH being indispensable on the autolysis of marine yeast, the lysis of yeast by animal tissue, and the activity of both yeast glucanase and yeast mannanase in animal tissue.

1. The optimum pH for the autolysis of yeast seemed to be 4.2 to 5.0, being similar to that of terrestrial yeast.

2. The existence of both yeast glucanase and mannanase was ascertained in the tissue of test animals, and the optimum pH of them ranged from 4.5 to 6.0 in the former, and from 4.5 to 5.5 in the latter, respectively.

3. When the yeast was pre-heated at 75°C for 5 min., the residual wall was produced by the action of *Crustacean* tissue-juice, however, no production of residual wall was observed in the case of *Pelecypoda* tissue-juice.

4. The lysis of autolyzed yeast was promoted by supplement of the juice that extracted from *Crustacean* tissue.

5. The residual wall could not be dissolved by the juice of animal tissue.

前報<sup>1)</sup>で、海洋酵母がアルテミア *Artemia salina* とミジンコ *Daphnia sp.* の有用な餌料となることを示した。各種下等動物が細菌や酵母を餌料とすることは広く知られているが表面にかたい細胞壁を持つ微生物やクロレラのような単細胞藻類を動物が摂餌して栄養源にするためには、橈脚類<sup>2)</sup> やオキアミ類<sup>3)</sup> あるいは二枚貝などにみられるような餌類の口器あるいは胃内壁の刺などによる細胞壁の物理的な破壊および酵素や食胞による細胞壁の化学的分解が必要と考えられる。細菌のみならずカビや酵母の細胞壁<sup>4-11)</sup> とその分解酵素系<sup>7, 12, 13)</sup> 及び自己消化<sup>14-16)</sup> についての報告は数多くみられる。また海洋に酵母が存在することは古くから知られているが、細菌の場合には陸棲型と海洋型の性質上の相違点が明らかにされているのに反し、酵母の場合には両者の相違点は不明である。

\*1968年6月日本水産学会九州支部例会(於宮崎市)にて発表した

\*\*鹿兒島大学水産学部水産化学教室(Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

本研究は、海洋から分離した酵母と陸上酵母の自己消化における最適 pH を比較すると共に、更にこれら酵母を餌料として利用する観点から動物の消化酵素系に、酵母の細胞壁分解酵素 (Lytic enzyme of yeast cell wall) 系が分布するか否かを明らかにするため、細胞壁の構成々分として知られている酵母グルカンおよび酵母マンナンなどの多糖類分解酵素の存在を追究した。その結果、甲殻類や斧足類などの供試動物には酵母細胞壁分解酵素系が一部存在することが明らかとなり、更に Residual wall (後出) を消化し得ないことも明らかとなったので報告する。

### 実 験 方 法

供試酵母: *Torulopsis dattila*, *T. famata*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus*, *Sporoboromyces salmonicolor* 及び baker's yeast の 6 種を用い、自己消化はこれ等を生理食塩水で 2 回洗滌し、表面に附着した培地成分を除去したものについてまた供試動物の酵素による分解試験も同様に処理した酵母を用いて行なった。

供試動物および動物組織ジュース調製法<sup>18-20)</sup>: アサリ *Tapes sp.*, ハマグリ *Meretrix sp.*, マガキ *Crassostrea gigas*, アルテミア *Artemia salina*, ミジンコ *Daphnia sp.*, およびアミ *Neomysis japonica* を用いた。アミ, ミジンコ, アルテミアはそのまま, アサリ, ハマグリ, マガキ, シジミは生剥身に等量の氷冷した水を加え氷冷しつつ 1 分間ホモジナイズし, 3,000rpm で 10 分間遠心分離し得られた上澄液を  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存し, 使用前に解凍し生じた沈澱をさらに除去して上澄液をとり酢酸で pH4.4 に調整したものを動物組織ジュース A, 上澄液 1 部に水 5 部を加えたものを動物組織ジュース B として用いた。

基質調製法: 酵母グルカンは HASSID 氏等<sup>6)</sup> の方法, 酵母マンナンは HAWORTH 氏<sup>21)</sup> の方法により調製した。

酵母染色法: 酵母の染色法は Löffler のアルカリ性メチレンブルー染色法及び細胞壁染色法<sup>17)</sup> によった。

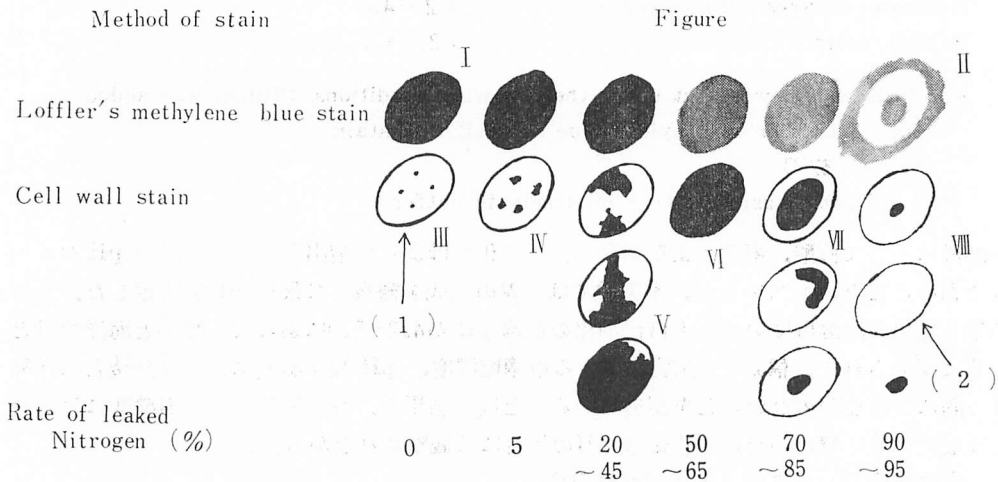
測定法: 粗蛋白の定量は micro Kjeldahl 法, および Kjeldahl-ninhydrin 法, アミノ酸は van Slyke 氏法, 糖は可溶性の多糖類を測定出来る phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 法をそれぞれ用いた。

### 結 果 と 考 察

#### 自己消化による酵母細胞壁の変化

細菌を自己消化させると菌懸濁液の濁度が低下し、最後に ghost cell が残るが、酵母およびカビは自己消化後でも細胞壁が残り、このために濁度低下が少ないことが知られている。

Fig.1 は酵母を自己消化させた場合、メチレンブルー染色法でその経過を示したもので、酵母は自己消化前には (I) のように全体が濃青色に染色されるが、自己消化が進行するにつれて次第に薄く染色されるようになり、最後には (II) のように残された細胞壁はメチレンブルーでは全く染色されず周囲の状態からその存在が認められるようになる。一方細胞壁染色法によると、自己消化前の酵母では、(III) のように細胞壁が濃青紫色に染色されて酵



**Fig.1.** Microscopic views of autolyzed yeast cell  
 (1) cell wall (2) residual wall

Autolysis was carried out under the following conditions ; (Toluol was added)  
 pH : 4.3 Temp. : 37° C  
 5 g pressed baker's yeast + 500ml succinate buffer

母の周辺にリング状にみられ、内部は薄赤紫色に染まりそのなかに濃青紫色の数個の点が認められる。自己消化が起きると(Ⅳ)のように点が拡がり始め、やがて(Ⅴ)のように細胞壁と内部の区別がつけ難くなる。この時の窒素の溶出率は20~40%である。更に自己消化が進行すると(Ⅵ)のように全体が濃紫色に染まり、窒素の溶出は50%を越すようになる。次の段階では(Ⅶ)のように周辺部より薄桃赤色に染色される部分がリング状に出来て、これが次第に内部に向かって拡大する。この状態はカビを嫌氣的に自己消化させた場合<sup>15)</sup>と同様である。最後の段階では(Ⅷ)のように紫色の小さな点を残すのみとなり(この紫色の点が細胞壁より外に出ている例もみられる)、薄桃赤色の周辺は薄紫色にリング状に染色されて自己消化後に残る細胞壁がこれである。生活細胞のもつ細胞壁 Natural cell wall (以下CWと略記)と区別するために Residual wall (以下RWと略記)と呼ぶことにする。本報においてはこのRWの生成をメチレンブルー染色法および細胞壁染色法により検査し、自己消化の度合および動物組織ジュースによる酵母分解の有無を表示することとした。

**海洋酵母の自己消化最適pH**

海洋酵母の自己消化の最適 pH を調べた結果は Table 1 の通りである。VOSTI 等<sup>14)</sup>は三種

**Table 1.** Optimum pH for production of residual wall by autolysis of yeast

Name of yeast	Optimum pH for autolysis of yeast
<i>Torulopsis dattila</i>	4.4—4.8
<i>Torulopsis famata</i>	4.4—5.0
<i>Cryptococcus albidus</i>	4.6—4.8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4.4—4.8

<i>Sporoboromyces salmonicolor</i>	4.2—4.6
Baker's yeast	4.2—4.4

Autolysis was carried out under the following conditions (Toluol was added)

Stain : Löffler's methylene blue and cell wall stain

Temp. : 37°C

1 ml yeast suspension + 5 ml succinate buffer

の酵母について核酸、窒素および磷酸の自己消化酵母よりの溶出量を測定し最適 pH が 4～5 であることを示しているが、本実験では RW の生成を観察して最適 pH を決定した。その結果 5 種の海洋酵母はいずれも自己消化の最適 pH が 4.2～5.0 にあって、陸棲と海洋酵母との差は認められず、信濃<sup>22)</sup>が生育に対する最適塩濃度、pH 及び温度において陸棲と海洋酵母の間に大きな差のないことを認めているのと同じ結果で、海洋細菌の生育塩濃度におけるような特異性は酵母の自己消化最適 pH の場合には観察されなかった。

#### 動物組織ジュースによる海洋酵母の分解

加熱により自己消化酵素を失活させた海洋酵母に対する動物組織ジュースの分解作用を調べた結果は Table 2 の通りである。培養条件は酵母の懸濁液 1 ml に Succinate buffur

Table 2. Production of the residual wall (RW) by animal-juice-A from heated yeast

Animal juice	yeast heated at 75°C for 5 min.	yeast heated at 100°C for 5 min.
<i>Tapes sp.</i>	RW was not produced	RW was produced
<i>Corbicula leana</i>		
<i>Crassostrea gigas</i>		
<i>Meretrix sp.</i>	RW was produced	RW was produced
<i>Artemia salina</i>		
<i>Daphnia sp.</i>		
<i>Neomysis japonica</i>		

Six kinds of yeast were used (see Table 1)

Incubating conditions: (Toluol was added)

Temp. : 37°C      pH : 4.4

1 ml yeast suspension + 5 ml succinate buffer + 1 ml animal-juice-A

(pH4.4) 5 ml, 動物組織ジュース-A を 1 ml, 防腐剤としてトルオールを加え 37°C で静置及び振盪培養を行った。酵母を加熱する場合、75°C, 5 分間では外観上の変化はみられなかったが、100°C, 5 分間では外観上変化を来し、パン酵母も含めて海洋酵母に共通した変化は、生酵母や 75°C 加熱酵母に比べて若干丸くなることで、酵母の外形を形成する CW に何らかの変化があったものとみなされる。よって 75°C 及び 100°C 加熱の両酵母を実験に用い、前回と同様 RW の生成によって酵母の分解の有無を試験した。軟体動物のうち斧足類に属するアサリ、ハマグリ、カキ及びシジミのジュースでは 75°C 加熱酵母において RW を生成しないが、100°C 加熱酵母では RW 生成が認められた。このことから斧足類はその摂餌機構から 5 μ 程度の酵母を捕食出来る能力を持つが、摂餌しても生酵母を消化酵素のみで分解出来

ず、イガイ等に餌料として有効である例から生酵母を栄養源とするためには、細胞内消化が行われるものとみなされ、細胞外消化が行われるとすれば消化酵素が作用する前にCWの何らかの破壊が必要であると考えられる。これに反し甲殻類はミジンコ、アルテミア及びアマモジュースいずれも75°C加熱酵母に作用してRWを生成し、100°C加熱酵母ではこれが更に促進された。このことはこれらの動物が生酵母を摂取した場合、CWの物理的破壊なしに酵素が直接作用して栄養源を吸収し得る可能性を示し、これに物理的な破壊<sup>2,3)</sup>が加われば一層分解は早いものとみなされる。また動物組織ジュースを作用させて出来たRWは更に長時間(10日間)同じ動物組織ジュースを作用させても分解されなかった。75°Cと100°C加熱の間における斧足類ジュースの分解性の違いは75°C以上の加熱によってCWに何らかの変化を起したものと解されるが、RWが依然として残る点から、変化を受けたCWの部分がRWに関係がなかったか、あるいはRWが変化を受けても大きな熱破壊でなかった何れかであろうと考えられる。

#### 動物組織ジュースによる酵母細胞壁多糖類の分解

動物ジュースによる酵母CWを構成する多糖類すなわち酵母グルカン及び酵母マンナンの分解及びその最適pHを調べた結果はFig. 2の通りである(培養条件はFig. 2に記した)。海産軟体動物及び節足動物の持つ多糖類分解酵素、すなわち $\alpha$ -セルロース、CMC、グルコマンナン、白根マンナン、キシラン、寒天、アルギン酸およびリヘナン等の分解酵素活性については橋本等<sup>10)</sup>、大槻<sup>23)</sup>、大島<sup>24)</sup>、Okada<sup>27)</sup>等多くの研究があり、イセエビ中にグルコマンナン分解酵素の存在することが知られているが、酵母グルカン及び酵母マンナンへの作用についての報告はみられない。

本実験において甲殻類ミジンコ及びアルテミア、斧足類カキ及びシジミはいずれも強力な酵母グルカン分解活性を有し、最適pHは4.5~6.0にあることが明らかとなった。MYER等<sup>10)</sup>は酵母を分解するカタツムリの中腸腺ジュースの酵母グルカン分解活性は低いとしているが、これは酵素活性力試験を遊離還元糖の測定によって行ったためで、ラミナラン分解能が大であったことから酵母グルカンを構成するグルコースの結合様式である $\beta$  1-3及び $\beta$  1-6の両glucosidic linkage<sup>5)</sup>の内の $\beta$  1-6結合のために遊離還元糖の生成が少なかったのではないかと考えられる。最適pHはカタツムリでは5.5で本実験における四種の供試動物の最適pHと大差がない。酵母マンナン分解酵素活性は、斧足類では強力であったが甲殻類ではその $\frac{1}{2}$ 程度であった。いずれも最適pHは4.5~5.5でカタツムリ5.0と一致した。斧足類の酵母マンナーゼ活性が甲殻類のそれより強力であったことから、前の実験の斧足類ジュースが甲殻類ジュースより酵母を分解し難いという原因は酵母マンナンによるものではなく、また酵母グルカナーゼ活性が両者ともに高いので酵母グルカンによるものでなく、前記の分解され難い原因は酵母CW多糖類以外に起因するものであると考えられる。前報でアルテミア餌料として有用な酵母が*Torulopsis dattila*及び*T. famata*で、*Cryptococcus albidus*、*Rhodotorula mucilaginosa*及び*Sporobromyces salmonicolor*などはそれ程有用ではないことを報告した。ROOK等<sup>4)</sup>によれば*Torula sp.*はそのCW中にマンノースが少なくてグルコースが多く、*Rhodotorula sp.*及び*Sporobromyces sp.*はマンノースが多くてグルコースが少ないとき、更に著者等は鯉に間断なく給餌すると約3時間で餌料に指標として混合したカロチノイド系色素の色が糞に認められるようになること、及びクルマ

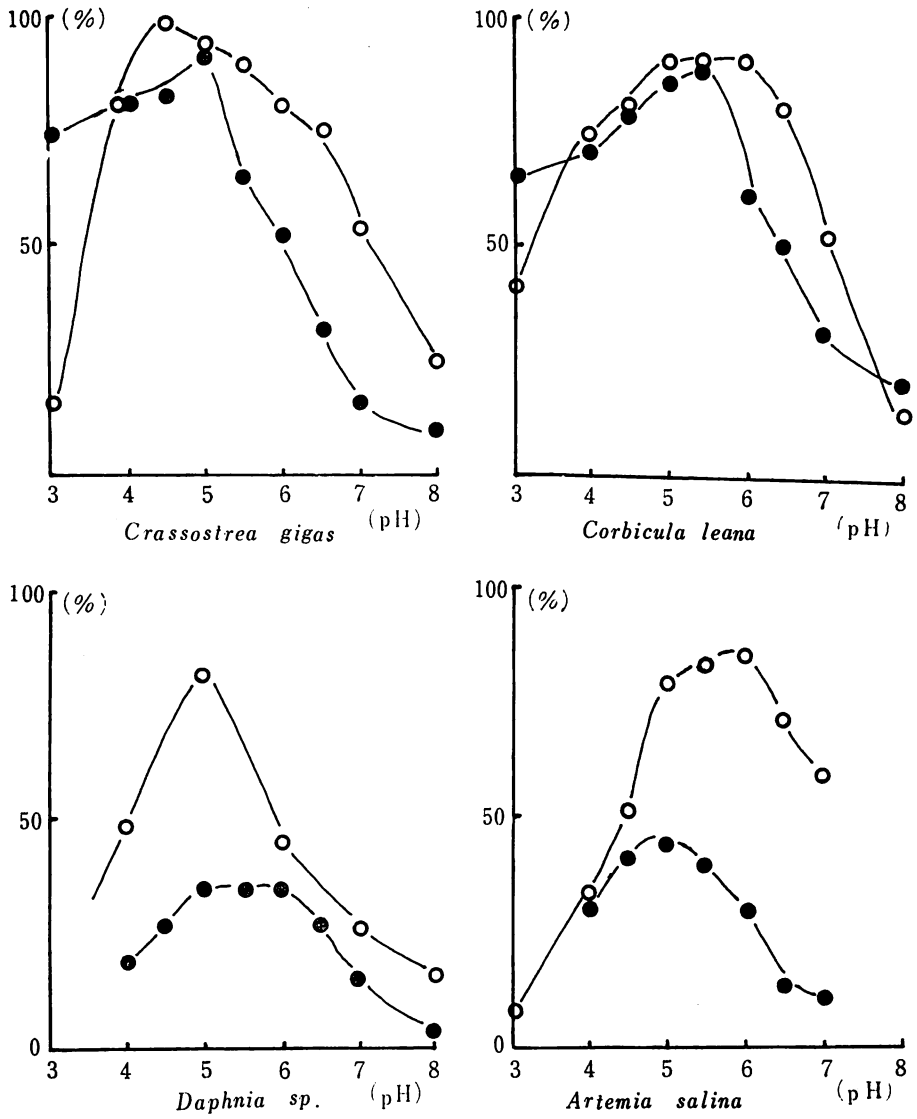


Fig.2. Yeast glucanase and mannanase activity of animal - juice - B  
 ○ — ○ yeast glucanase activity  
 ● — ● yeast mannanase activity

Incubating conditions; (Toluol was added)

Temp. : 37°C Term: 10 days

1 ml animal - juice - B + 5 ml McIlvaine buffer + 10 mg substrate

エビでは摂餌後12時間以内に色素を含んだ糞の排泄が認められるようになることを観察しているが、更に PROVASOLI等<sup>26)</sup>がアルテミアを voracious particle-feeder としている点などから判断して5種の海洋酵母の有用度の相違は、アルテミアが酵母を摂取しても排泄までの時間が短いために、CWにマンノースを多く含む酵母が有用度の高い酵母より分解され難く、酵母の持つ栄養が未利用のまま排泄されることに起因したとも考えられる。酵母の電子顕微鏡写真によればCWとみられる外限界膜は三層よりなり<sup>25)</sup>、その中間層が蛋白層であると考えられている。CWの構成々分はグルカン、マンナン、蛋白質及びキチンよりなり、その結合様式は、i. glucan単独かglucan-protein, ii. phospho-glucomannan-proteinか或いはglucomannan-protein-Iとglucomannan-protein-II（このprotein-IIはkeratinとされる）iii. chitinは単独かあるいは上記の化合物の何れかに結合しているか不明確である。しかし酵母のCW分解酵素系は $\beta$ 1-3グルカナーゼとプロテアーゼ<sup>12)</sup>或はこれに更に別の酵素が必要である<sup>27)</sup>と考えられている。この別の酵素にマンナーゼが含まれるのであろう。

このことはカビのCWの生成成分が $\beta$ 1-3グルカンとキチンより構成されその分解には $\beta$ 1-3グルカナーゼとキチナーゼが必要<sup>7)</sup>であるのと一致する。斧足類消化酵素系に酵母多糖類分解酵素の存在が明らかとなったが、一般に斧足類の消化酵素は蛋白分解酵素活性が弱いとされ、更に斧足類の生剥身を細かく切り40~45°Cで自己消化せしめても容易に液化せずこれに蛋白分解酵素を加えることにより容易に液化する点などから、本実験に用いた斧足類組織ジュース中の蛋白分解酵素活性は弱いものと考えられる。よってアサリ及びシジミジュースに細菌性中性蛋白分解酵素（この酵素単独では75°C加熱酵母に作用しない）を加えて75°C加熱酵母に作用せしめるとRWを生成する。同様に甲殻類組織ジュースに蛋白分解酵素を加えて100°C加熱酵母に作用させるとRWの生成が促進される。よって75°C加熱酵母に斧足類ジュースを作用させてもRWを生成しない原因が蛋白分解酵素によることが明らかとなった。

またRWは酵母CWの構成々分、whole cellの熱に対する性質<sup>10)</sup>および動物組織ジュース中の酵素活性などからケラチン様のものと考えられるが、120°C、10分間加熱RWにアミ組織ジュースを作用させた結果、RWに変化は認められるがRWは消失せず、また2-メルカプトエタノールを加えて作用させても同様であった。このことはRWにケラチン以外の第三の膜とされるchitinous natureが含まれるか、酵母CWの完全な溶解には特定の蛋白分解酵素が必要<sup>9, 12, 13)</sup>であるかのいずれかであろう。

#### 動物組織ジュースによる自己消化酵母の消化

酵母を水産動物の餌料とする場合、自己消化を起こさせた酵母を使用すると一層効果があるのではないかと考え、自己消化を起こさせた酵母に動物ジュースを作用させて、その消化促進効果を調べた。その結果はFig. 3の通りである。压榨パン酵母にアセトン30%になるように加えて1時間放置して、自己消化を起こさせた酵母は24時間でRWを生じるが、アミジュースを作用させると更に早く、12時間でRWに変化するとともに窒素も約90%が溶出した。パン酵母にトルオールを加えて、全窒素とアミノ態窒素の溶出量に比較的差のないとされるpH6.0で自己消化させ、これにアルテミアジュースを作用させると、6及び12時間目では自己消化区の窒素の溶出が7及び11%であるのにアルテミアジュース区は45及び66%で酵

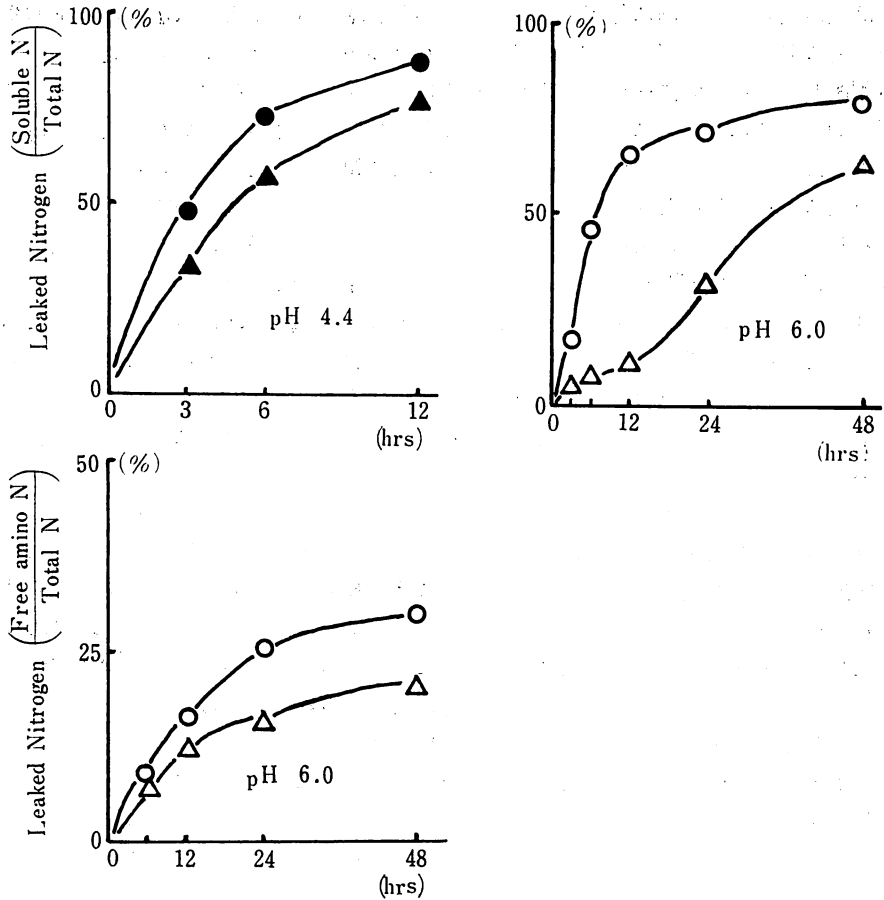


Fig.3. Stimulative effect of animal-juice-B on yeast autolysis

- ▲ ——— ▲ yeast pretreated with acetone
- ——— ● yeast pretreated with acetone + *Neomysis*-juice-B
- △ ——— △ yeast only
- ——— ○ yeast + *Artemia*-juice-B

Incubating conditions; (Toluol was added)

Temp. : 37°C

1g pressed baker's yeast + 100ml succinate buffer + 10ml animal-juice-B

母の消化を大きく促進しているが、遊離アミノ態窒素の溶出には6及び12時間目では特に促進効果はなく、初期6及び12時間目の全窒素と遊離アミノ態窒素の溶出率の差が大きいことから初期の消化促進効果による溶出窒素はペプチド態の窒素が多いものと考えられる。生成したRWは更に消化時間を長くしても分解されなかった。すなわち海洋酵母をアルテミア等の餌料として用いる場合、生酵母に自己消化作用を失活せしめないような前処理をなし死酵母にすることにより、不消化物であるRWが存在しても自己消化作用と動物の持つ消化酵素の相乗作用により酵母の消化吸収は一層早くなり、栄養面から欠陥のある酵母は別にして



全ての酵母を餌料として価値の高いものになし得ると考えられる。自己消化酵母への消化促進効果は精製酵素を用い実験した結果 i. 蛋白分解酵素（トリプシン，パパイン，細菌性中性酵素）には認められず，ii.  $\beta$  1—3 グルカナーゼを含むセルラーゼに認められた。このことは強力な酵母細胞壁多糖類分解酵素を有し，蛋白分解酵素活性の低い斧足類が摂取した酵母を栄養源として消化吸収する方法に興味ある問題を提起するものである。

### 要 約

数種の甲殻類及び斧足類の組織ジュースによる海洋酵母の細胞壁消化実験を行い次の結果を得た。

1. 海洋酵母の自己消化最適 pH は 4.2~4.5 にあり陸上酵母のそれと一致した。
2. 供試動物組織ジュースには酵母グルカン及び酵母マンナンを分解する酵素が存在し，その最適 pH はそれぞれ 4.5~6.0, 4.5~5.5 であった。
3. 斧足類組織ジュースは 75°C, 5 分加熱酵母から Residual wall を生成しないが，甲殻類ジュースは Residual wall を生成した。この相違は動物組織ジュースに含まれる蛋白分解酵素の活性差によるものである。
4. 自己消化酵母に甲殻類組織ジュースを作用させると酵母の消化が一層促進された。
5. Residual wall は供試動物組織ジュースによって分解されない。

本実験に当り御助言を戴いた本学柿本大彦教授に謝意を表します。

### 文 献

- 1) 高谷 周・金沢昭夫・柏田研一 (1967) : 鹿大水紀要, 16, 34.
- 2) 安楽正照 (1963) : プランクトン研連会報, 9, 10.
- 3) 根本敬文 (1967) : 同上, 松江博士記念号, 157.
- 4) CROOK, E. M., and I. R. JONSTON (1962) : *Biochem. J.*, 83, 325.
- 5) MANNERS, D. J., and J. C. PATTERSON (1966) : *Biochem. J.*, 96, 19C.
- 6) HASSID, W. Z., M. A. JOSLYN, and R. M. MCCREADY (1941) : *J. A. C. S.*, 63, 293.
- 7) JOHNSTON, I. R. (1965) : *Biochem. J.*, 96, 651, 659.
- 8) BACON, J. S. D., E. D. DAVIDSON, D. JONES, and I. F. TAYLOR (1966) : *Biochem. J.*, 101, 36C.
- 9) NICKERSON, W. J. (1963) : *Bact. Rev.*, 27, 305.
- 10) BACON, J. S. D., B. D. MILNE, I. F. TAYLOR, and D. M. WEBLEY (1965) : *Biochem. J.*, 95, 28C.
- 11) SLODKI, M. E. (1966) : *J. B. C.*, 241, 2700.
- 12) 田端可郎・平緒一暁・照井堯造 (1965) : 醸工, 43, 766, 772.
- 13) 田端可郎・照井堯造 (1965) : 醸工, 43, 777.
- 14) VOSTI, D. C., and M. A. JOSLYN (1954) : *Apply. Microbiol.*, 2, 70, 79.
- 15) ARIMA, K., T. UOSUMI, and M. TAKAHASHI (1965) : *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1033.
- 16) UOSUMI T., M. TAKAHASHI, and K. ARIMA (1965) : *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1050.
- 17) 吉田長之・田中三郎・西野健二・福家勇・角谷公・高石憲治 (1954) : 日細誌, 9, 973.
- 18) MYERS, F. L., and D. H. NORTHCOPE (1958) : *J. exp. biol.*, 35, 635.
- 19) 橋本芳郎・小野間吉之輔 (1946) : 日水誌, 15, 253.
- 20) OKADA, G., T. NISHIZAWA, and K. NISHIZAWA (1966) : *Biochem. J.*, 99, 214.
- 21) 江上不二夫 (1955) : 多糖類化学 (共立出版).
- 22) 信濃 晴雄 (1962) : 日水誌, 28, 1113.

- 23) 大槻虎男 (1930) : 動雜, **42**, 411.
- 24) 大島幸吉 (1931) : 日農化, **7**, 382.
- 25) 岩田和夫・平田恒彦 (1966) : 日細誌, **21**, 533.
- 26) PROVASOLI, L., and K. SHIRAISHI (1959) : *Biol. Bull.*, **177**, 347.
- 27) 黒田彰夫・大和田式子 (1967) : 多糖類分解酵素に関するシンポジウム (於山口大学) .