

〔醸酵工学会誌 第67巻 第6号 491-498. 1989〕

火落菌の細胞壁溶解とプロトプラスト調製条件

大淵 和彦*・東田 優子・神田 晃敬
浜地 正昭・本馬 健光

大関酒造株式会社総合研究所

(平成元年2月28日受付 平成元年9月1日受理)

Conditions of lysis and protoplast formation of hiochi-bacteria. KAZUHIKO OHBUCHI, YUKO HIGASHIDA, AKIHIRO KANDA, MASAOKI HAMACHI and TAKEMITSU HONMA (General Research Institute, Ozeki Sake Brewing Co., Ltd., 4-9 Imazu Dezaike-cho, Nishinomiya-shi, Hyogo 663) *Hakkokogaku* 67: 491-498. 1989.

Hiochi-bacteria was not lysed by a single use of commercial enzymes, but was lysed by a combination of three sorts of enzymes (30 μ g/ml lysozyme, 60 μ g/ml *N*-acetylmuramidase SG, 2000 U/ml achromopeptidase). The most effective enzyme for cell lysis in this combination was different depending on strains (true hiochi-bacilli or hiochi-lactobacilli of homo- or hetero-fermenters). In this system, hiochi-bacteria cells in stationary phase were more sensitive to lytic enzyme than its cells in logarithmic phase. Di- or tri-saccharides and organic acid salts were appropriate for osmotic stabilizers in protoplast formation of hiochi bacteria cells. But mono-saccharides (sugar-alcohols) were not appropriate for the stabilization of protoplast and inorganic salts inhibited lysis of cells.

火落菌は、15%以上のアルコール存在下で生育できる乳酸菌の総称であり、清酒産業においては、最も微生物汚染に注意を払っている細菌群である。それらは、好アルコール性、耐アルコール性などの違いにより、真性火落菌、火落性乳酸菌に分類され、各々乳酸発酵形式によって、ホモ型、ヘテロ型に分けられている。特に、火落性乳酸菌には複数の菌種が含まれており、分類学上同じ種に属しながらもアルコール耐性を持つが故に一般乳酸菌とは区別される。しかしながら、火落菌のアルコール耐性については、未知の部分が多く、現象として細胞壁の厚み¹⁾や細胞膜中の脂肪酸組成²⁾が変化しているともいわれているが、その耐性機構について検討を加えた報告はほとんどない。

著者らは、エタノール存在・非存在下で生育させた火落菌による、プロトプラストの形成程度や浸透圧抵抗性などを調べることによって、火落菌のアルコール

耐性と細胞表層の関係について検討することを考え、まず、細胞壁の溶解条件とプロトプラストの調製条件について検討した。

一般的に、グラム陽性細菌や一部のグラム陰性細菌の細胞壁溶解には、lysozyme が用いられることが多いが、乳酸菌においては、lysozyme によって十分な溶菌が引き起こされないことがあり、mutanolysin (*N*-acetylmuramidase SG)^{3,4)}を用いたり、化学用 α -amylase⁵⁾を併用する例が報告されている。また、百瀬ら⁶⁾は、火落菌 DNA を抽出分離する際に、lysozyme を用いて溶菌させている。しかし、著者らの結果では、lysozyme 単独では十分な溶菌を引き起こすことはできなかった。また、原ら⁷⁾も、lysozyme の火落菌に対する溶菌作用はさほど強くないと報告している。

そこで本報では、市販酵素を単独もしくは、併用することにより、同一条件で火落菌細胞壁を溶解する条件を求め、プロトプラストの調製を行ったので報告する。

* 連絡先, Corresponding author.

実験方法

使用菌株 使用した菌株は、火落性乳酸菌ホモ発酵型 (*Lactobacillus acidophilus* H-7, S-4, A-1), 火落性乳酸菌ヘテロ発酵型 (*L. fermentum* H-34, S-7), 真性火落菌ホモ発酵型 (*L. homohiochii* S-24, *L. homohiochii* S-40), 真性火落菌ヘテロ発酵型 (*L. fructivorans* S-14, *L. fructivorans* H-1), 対照としての一般乳酸菌 (*L. acidophilus* L54A, *L. casei* C-1-Ca) である。なお, A-1, L54A, C-1-Ca は, 当社保存株, 他の菌株は, 国税庁醸造試験所より分譲を受けたものである。

培地および培養方法 培地は, 市販の SI 培地 ((財)日本醸造協会製) の水溶液を濾過し寒天を除いたもの, または同様な培地組成 (10 g/l yeast extract, 5 g/l Peptone, 25 g/l glucose, 0.1 g/l $MgSO_4$, 2.5 mg/l $MnSO_4$, 2.5 mg/l $FeSO_4$, 5 mg/l DL-mevalolactone, pH 5.1~5.2) に調製したものに, 115°C, 5 分間殺菌後, エタノールを10%になるよう添加 (一般乳酸菌では, エタノール無添加) して使用した。この SI 培地にて, 30°C で静止期まで培養した菌液を, 新しい SI 培地に1%接種し, 30°C で7~10日間静置培養した。

細胞壁溶解酵素 lysozyme (LYS) は, Sigma Co. 製, *N*-acetylmuramidase SG(NAM) は, 生化学工業 (株) 製, achromopeptidase (ACH) および α -amylase (化学用) は, 和光純薬工業 (株) 製のものを使用した。

溶菌の測定 遠心集菌菌体を, TMB (0.01 M Tris, 0.01 M malic acid, 4 mM $MgCl_2$ pH 6.8) の緩衝

液で洗浄後, 同緩衝液に懸濁した。細胞懸濁液は, 予め10倍希釈液の 660 nm における吸光度を測定しておき, 最終的な吸光度が計算上2.0になるように, TMB を用いて希釈調製した。この液0.8容に対し, TMB で各濃度に調製した酵素溶液0.2容を加え, 37°C で緩く振盪した。反応時間は断わらない限り2時間である。溶菌度 (実際には溶け残りの量を表し, 数字が小さいほどよく溶けていることを示す) は, 次式によって求めた。

$$\text{溶菌度} = \frac{\text{酵素添加区分 660 nm の吸光度}}{\text{酵素無添加区分 660 nm の吸光度}} \times 100$$

プロトプラストの調製 上記溶菌の測定の項と同様に細胞懸濁液を調製した。このときの計算上の吸光度は5.0になるように, TMB で調製した。プロトプラストの調製は, この細胞懸濁液0.3容に対し, TMB で各濃度になるよう調製した浸透圧調整剤 (Table 2, Fig. 4, Table 3 に示した各種溶質) 0.5容, 酵素溶液0.2容を加え, 37°C で2時間緩く振盪した。また, Fig. 4 の浸透圧調整剤を検討する際には, 酵素無添加の区分および酵素添加区分を各2時間反応後, TMB または浸透圧調整剤で, 10倍希釈し, その吸光度の差を形成プロトプラスト量と判断した。

実験結果および考察

酵素単独使用による火落菌の溶菌 最初に, 代表的な乳酸菌, 火落菌細胞に対して, 市販酵素を単独作用させた。その結果を Table 1 に示す。単独酵素では, 一般乳酸菌, 火落菌ともに十分な溶菌を起こすこ

Table 1. Lysis of *Lactobacillus* and hiochi bacteria cells by lytic enzymes.

Enzymes		Lysis (%)																	
		L54A			C-1-Ca			H-7			H-34			S-40			H-1		
		1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
LYS	20 μ g/ml	98	100	100	98	99	100	100	100	100	82	72	68	94	86	82	97	100	100
	100 μ g/ml	97	100	100	100	100	100	100	101	100	78	58	54	89	84	77	97	96	93
	500 μ g/ml	100	102	100	110	112	115	103	100	103	101	95	79	91	85	80	73	68	58
ACH	200U/ml	100	101	102	97	95	94	99	98	98	100	100	98	91	86	84	100	101	97
	1000U/ml	101	102	103	100	95	95	99	98	98	100	100	97	82	73	72	101	97	98
NAM	20 μ g/ml	89	89	85	85	78	77	91	88	89	100	97	95	84	84	84	94	89	87
	100 μ g/ml	85	80	76	81	73	71	93	93	91	97	70	59	86	77	74	90	85	78
α AM	1000 μ g/ml	100	101	105	101	95	98	100	99	99	101	100	101	77	74	73	103	100	101

Each kind of cells was suspended in TMB and incubated with the indicated enzymes for 1, 2 and 3 h at 37°C. The absorbance of cell suspension were measured at 660 nm. The degree of lysis was indicated by ratio of absorbance with enzyme against without enzyme. LYS, lysozyme; ACH, achromopeptidase; NAM, *N*-acetylmuramidase SG; α AM, α -amylase.

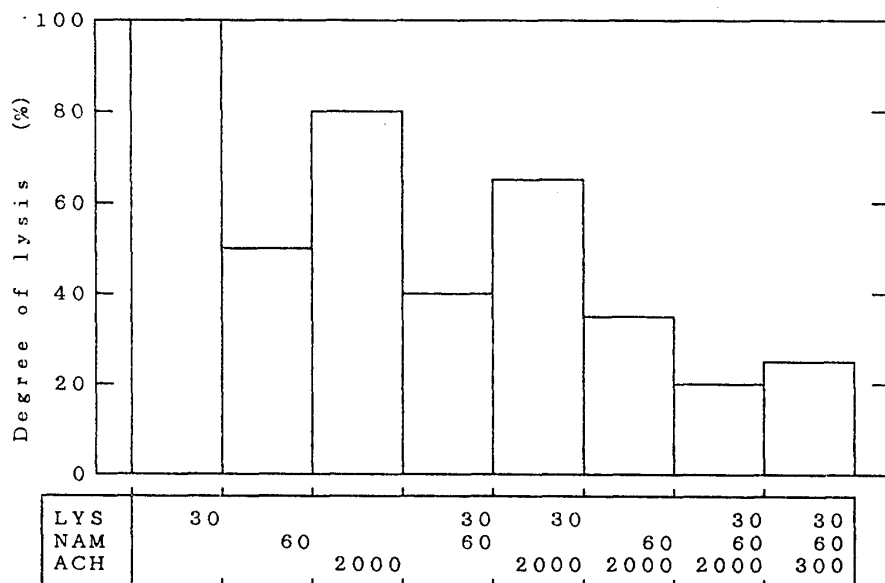


Fig. 1. Lysis of *hiochi-lactobacilli* homofermenter A-1 by single and combined enzymes. Cells were suspended in TMB and incubated with an indicated enzyme combination at 37°C for 2 h. LYS, lysozyme ($\mu\text{g/ml}$); NAM, *N*-acetylmuramidase SG ($\mu\text{g/ml}$); ACH, achromopeptidase (U/ml).

とはできなかったが、一般乳酸菌に対しては、NAM がやや効果を示し、ヘテロ発酵型の火落菌 (H-34, H-1) に対しては、LYS がやや効果的であった。菌のタイプ別では、火落性乳酸菌ホモ発酵型に属する H-7 が最も溶菌しにくかった。

酵素併用による火落性ホモ型乳酸菌の溶菌 次に、最も溶菌性の劣った火落性乳酸菌ホモ発酵型に対して、酵素併用による溶菌を試みた。ここでは供試菌株として A-1 を用いた。最終決定した酵素濃度での単独および組合せの結果を、Fig. 1 に示す。溶菌酵素の組合せは、先ず最も作用の強かった NAM の最適濃度を検討し、60 $\mu\text{g/ml}$ の値を得た。次にその濃度を基本とし、LYS の濃度を求めた。60 $\mu\text{g/ml}$ NAM における LYS の最適添加濃度は 30 $\mu\text{g/ml}$ であった。LYS の場合、500 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度では、逆に吸光度が増加する現象が認められた。更に 60 $\mu\text{g/ml}$ NAM, 30 $\mu\text{g/ml}$ LYS の組合せに対する ACH の添加濃度を求め、最終的に 60 $\mu\text{g/ml}$ NAM, 30 $\mu\text{g/ml}$ LYS, 2000 U/ml ACH という値を決定したが、ACH の溶菌効果は、最高 2000 U/ml までの濃度範囲では、酵素濃度に依存した。

A-1 株の場合、最も溶菌の程度が高いのは、3 種の酵素の組合せであるが、このうち溶菌の主体をなしていたのは、NAM であった。LYS と ACH は単独での溶菌作用は低く、NAM との併用効果の方が高かった。

酵素併用による他の火落菌の溶菌 前節で決定した酵素条件 (60 $\mu\text{g/ml}$ NAM, 30 $\mu\text{g/ml}$ LYS, 2000 U/ml ACH) によって、他の火落菌の溶菌が可能であるか、また、どの酵素が溶菌の主たる役割を果たしているかという 2 点を調べるため、タイプ別に 2~3 株ずつの代表的な火落菌に対して作用させた。Fig. 2 に示すように 3 種の酵素を組み合わせることによって、どのタイプの火落菌に対しても同一組合せ条件で十分な溶菌が可能であったが、主に作用する酵素は、菌種によって異なっていた。すなわち、火落性乳酸菌ホモ発酵型 (S-4, H-7, A-1) では、主に NAM が作用し、火落性乳酸菌ヘテロ発酵型 (S-7, H-34) では 3 種のいずれもが、真性火落菌ホモ発酵型 (S-24, S-40) では ACH が、真性火落菌ヘテロ発酵型 (S-14, H-1) では LYS と NAM が溶菌の主たる酵素であった。この結果は、菌種によって、細胞表層の構成成分または、構造が異なっていることを示すものと考えられる。またデータは示していないが、各菌株に対して最も効果的であった酵素を単独使用した場合溶菌が起らない時もあり、酵素を併用させた方がより安定して溶菌した。この原因は、酵素の特異性だけでなく、一定量の酵素を一定量の基質に作用させながらも、その作用にばらつきが見られるということから、菌の生育相の影響も考えられる。

生育相と溶菌 一般に、細胞は、静止期に比べ対

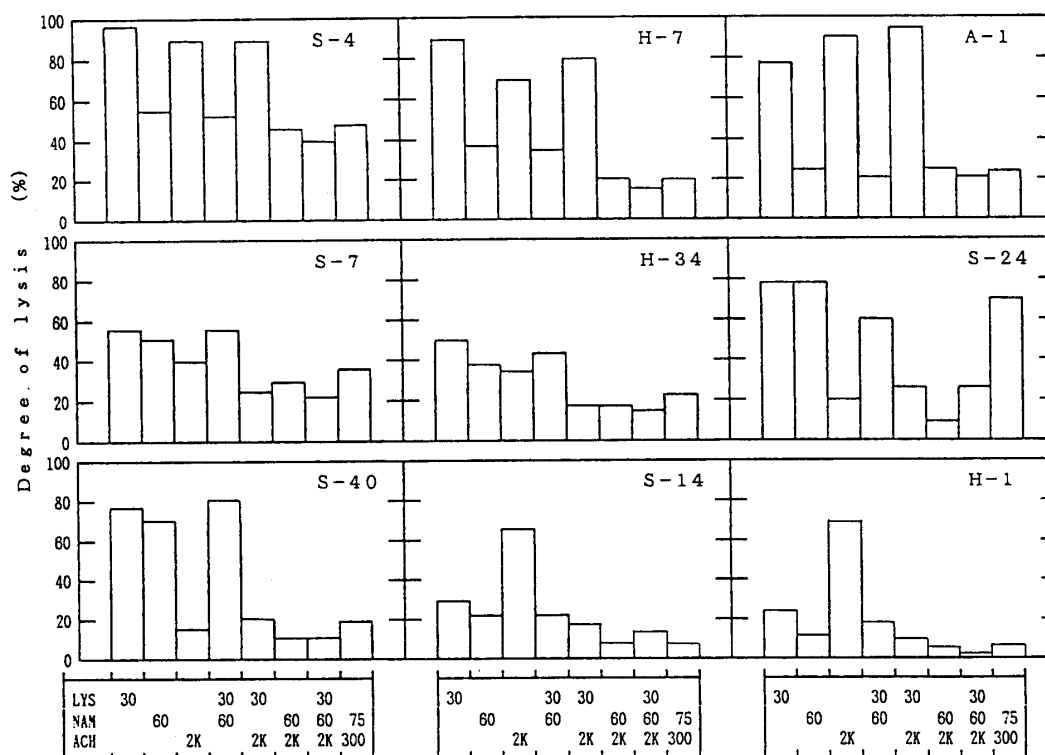


Fig. 2. Lysis of hiochi bacteria by single and combined enzymes.

The cells of each strain were suspended in TMB and incubated with an indicated enzyme combination at 37°C over night. LYS, lysozyme (μg/ml); NAM, *N*-acetylmuramidase SG (μg/ml); ACH, achromopeptidase (U/ml).

数増殖期の方が細胞壁溶解酵素の作用を受けやすいとされている。同様なことが、火落菌についてもいえるかどうか確認するため、対数増殖期と静止期の細胞に

対して酵素を作用させた。作用させた条件は、前節で決定した3種の酵素組合せ (60 μg/ml NAM, 30 μg/ml LYS, 2000 U/ml ACH) および、その比較とし

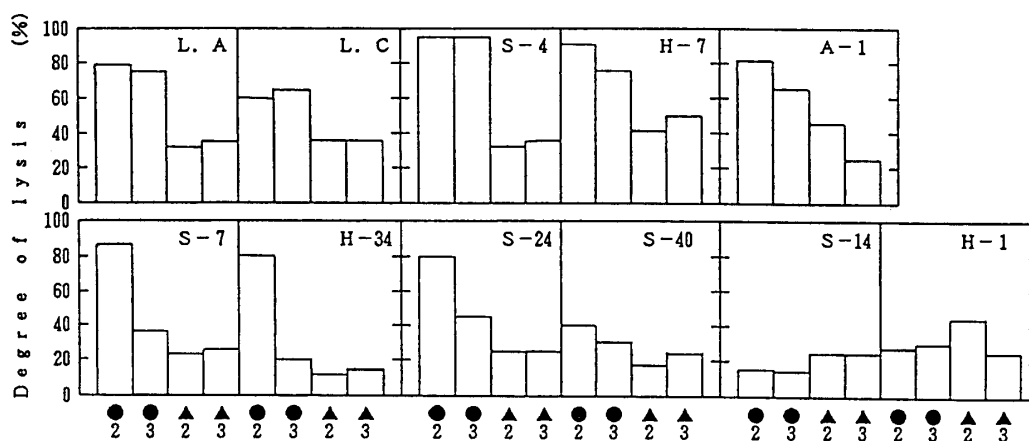


Fig. 3. The comparison of degree of lysis in growth phase between combinations of two, and three enzymes.

The cells of each strain were incubated with two or three combined enzymes. ●, logarithmic phase; ▲, stationary phase; 2, two enzymes combination (60 μg/ml NAM, 2000 U/ml ACH) and 3, three enzymes combination (30 μg/ml LYS, 60 μg/ml NAM, 2000 U/ml ACH).

てLYSを除いた2種(60 µg/ml NAM, 2000 U/ml ACH)である。Fig. 3に溶菌の結果を示す。2種の組合せにおいて、一般乳酸菌(L.A, L.C), 火落性乳酸菌(S-4, H-7, A-1, S-7, H-34)および真性火落菌のうちS-24は、静止期の方が感受性が高かった。3種の組合せにおいても一般乳酸菌および火落性乳酸菌ホモ発酵型(S-4, H-7, A-1)では、2種の場合と同様な結果であったが、火落性乳酸菌ヘテロ発酵型(S-7, H-34)および真性火落菌(S-24, S-40, S-14, H-1)については、生育相における違いがあまり認められなかった。2種と3種の酵素の組合せによる溶菌を比較すると、静止期においてはあまり大きな差が認められなかった。しかしS-7, H-34, S-24では、3種の組合せを用いると、2種の組合せに対して抵抗性を持つ対数増殖期の細胞でも溶菌された。

Tanigawa & Umezu¹⁾は、火落菌の細胞壁は、対数増殖期初期から徐々に厚みを増し、その厚みの増大は静止期に達するまで続くと報告している。この厚みの増大は、上記の結果から単純な現象ではないことが

示唆される。すなわち、2種類の酵素の組合せに対して対数増殖期よりむしろ静止期の細胞の方が感受性が高いこと、LYSを加えた3種の組合せでは対数増殖期の細胞でも溶菌できるものがあること、また酵素の単独使用では溶菌性が不安定なことなどから、火落菌の細胞表層は、菌が増殖して行く中で、細胞壁溶解酵素の作用を受ける構造または構成成分を変化させながらその厚みを増して行くのではないかと考えられる。

また、細胞分裂が活発である対数増殖期の細胞(Fig. 3 中●)の方が溶菌しにくかった点について、*Streptococcus faecalis*のlysozymeに対する感受性は、生育相が静止期に向うほど低下し、⁸⁾逆に*L. casei*のmutanolysinに対するそれは、静止期に向かうほど高かった⁹⁾などの報告がある。今回、火落菌は、静止期の細胞の方が対数増殖期のものより溶菌されやすかった。これが、火落菌または乳酸桿菌に固有な特異的現象であるのか、それとも今回用いたふたつの溶菌条件が、静止期の細胞をよりよく溶菌させる特別な条件で

Table 2. Influence of osmotic stabilizers on cell lysis.

Stabilizers	Conc.	Lysis (%)			
		Homo-fermenters		Hetero-fermenters	
		S-24	S-40	S-14	H-1
Without enzymes		100.0	100.0	100.0	100.0
Without stabilizer		10.8	22.3	16.0	10.6
KCl	0.9 M	100.2	—	84.0	—
MgCl ₂	0.9 M	82.1	—	55.2	—
sorbitol	0.9 M	9.7	—	12.0	—
	1.3 M	14.0	—	8.2	—
	1.8 M	12.0	—	6.1	—
mannitol	0.9 M	17.9	—	17.9	—
	1.3 M	12.8	—	7.2	—
	1.8 M	13.9	—	6.8	—
sucrose	0.5 M	9.2	—	34.1	—
	0.7 M	8.0	—	38.6	—
	1.0 M	—	19.9	—	8.5
raffinose	0.25 M	—	24.5	—	10.6
	0.75 M	—	32.3	—	11.7
Na-isoascorbate	0.4 M	—	37.8	—	76.6
	0.8 M	—	42.8	—	66.0
Na-succinate	0.8 M	—	35.8	—	60.0
	1.6 M	—	62.7	—	29.8

Each strain was suspended in TMB containing the indicated stabilizers with or without combined enzymes (30 µg/ml LYS, 60 µg/ml NAM and 2000 U/ml ACH) and incubated at 37°C for 2 h. —, data not measured in the experiments.

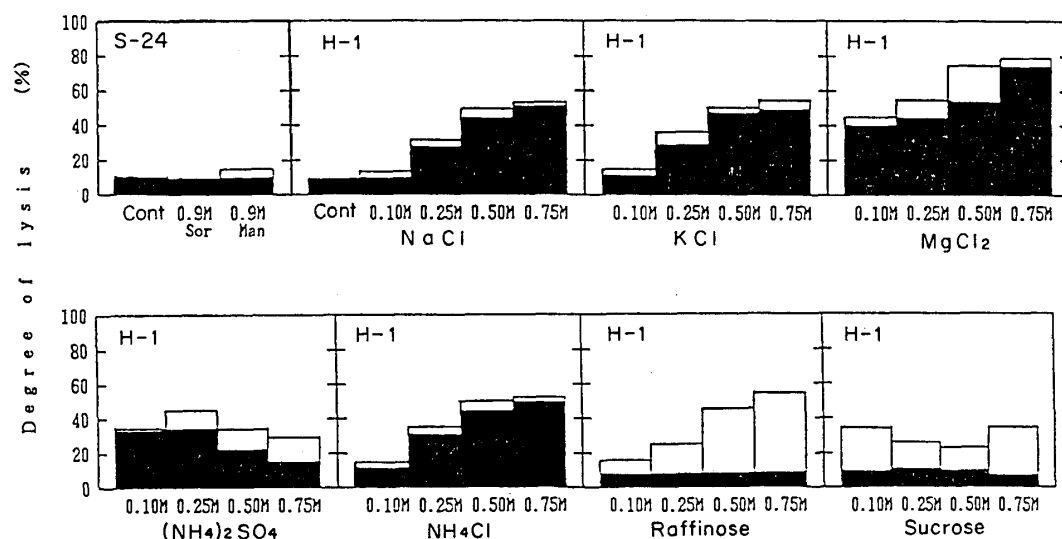


Fig. 4. Effects of osmotic stabilizers on protoplast formation.

The cells of each strain were suspended in TMB containing the indicated osmotic stabilizers with or without combined enzymes (30 $\mu\text{g/ml}$ LYS, 60 $\mu\text{g/ml}$ NAM, and 2000 U/ml ACH). After incubation at 37°C for 2 h, each reaction mixture was diluted to $\times 10$ volume with TMB with or without stabilizer. Then absorbance at 660 nm was measured. \square , the ratio of absorbance with enzyme against without enzyme after dilution with TMB containing stabilizer; \blacksquare , the absorbance decrease ratio of cell suspension diluted with only TMB; "Cont", the absorbance decrease of cell suspension incubated with enzymes in TMB except osmotic stabilizer.

Table 3. Osmotic stabilizers for protoplast formation.

Stabilizers	Conc.	Strains							
		A-1	H-7	S-7	H-34	S-24	S-40	S-14	H-1
KCl	0.9 M	×	—	—	—	×	—	×	—
Sorbitol	0.9 M	×	—	—	—	×	—	×	—
Mannitol	0.9 M	×	—	—	—	×	—	×	—
Arabinose	0.5 M	×	—	—	—	○	—	×	—
Sucrose	0.5 M	—	—	—	—	○	—	○	—
	0.7 M	—	—	○	○	○	—	○	—
	1.0 M	—	×	—	—	—	×	—	○
Melibiose	0.5 M	×	—	—	—	○	×	×	—
Raffinose	0.25 M	—	×	—	—	—	△	—	○
	0.5 M	△	△	—	—	○	△	×	○
Na-Citrate	0.9 M	○	—	—	—	×	×	×	—
Na-Isoascorbate	0.4 M	—	×	—	—	—	△	—	△
	0.8 M	—	×	—	—	—	△	—	△
	0.9 M	×	—	—	—	○	○	○	—
Na-Succinate	0.8 M	—	○	—	—	—	×	—	×
	0.9 M	○	—	—	—	○	○	—	×
	1.6 M	—	○	—	—	—	△	—	×
Na-Malate	0.5 M	×	—	—	—	△	○	×	—

Symbols: ○, formed protoplasts; △, contained intact cells; ×, not formed protoplasts; —, not tested.

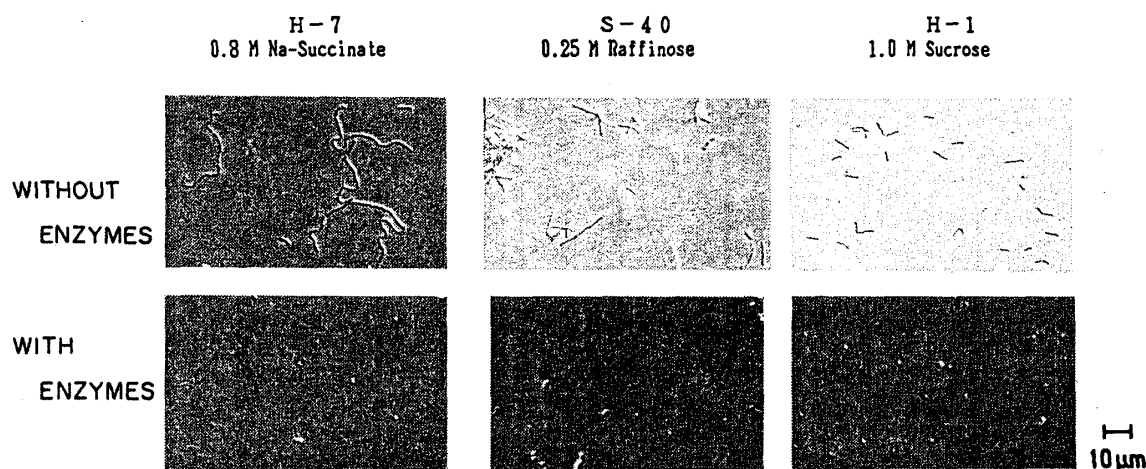


Fig. 5. Protoplast formation of hiochi bacteria.

The cells of each strain were incubated with or without enzymes in TMB containing indicated osmotic stabilizers at 37°C.

あったことによるものか、結論を得るには更に詳しい検討が必要であろう。

浸透圧調整剤の検討とプロトプラストの調製 続いて、火落菌プロトプラスト調製時の浸透圧調整剤について検討した。浸透圧調整の目的には、一般に、無機塩、糖類、有機酸塩などが用いられ、吸光度の減少が少ないものが選択される。Table 2 に、真性火落菌での結果を示した。吸光度の減少は、無機塩、有機酸塩、糖類の順で少なかった。

しかしながら、sucrose, raffinose などの糖を用いた場合、酵素を添加しなくても吸光度が低下する現象がみられた。すなわち、同じ細胞濃度でも、用いた浸透圧調整剤によって吸光度が異なることになる。そこで Fig. 4 では、真性火落菌において、同じ濃度の浸透圧調整剤存在下での酵素添加・無添加区分におけるバースト操作の有無による差を求めた結果を示した。

Fig. 4 中の“cont”（浸透圧調整剤非存在下で、酵素を作用させた区分）と比較して、無機塩は酵素による溶菌を阻害しており、その程度は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を除いて濃度が増すほど強くなる傾向がみられた。これが、浸透圧調整剤に無機塩を使用した場合の吸光度の減少が少なかった原因と考えられる。それに対して糖類は、バースト操作後の吸光度が、“cont”と同程度であることから、溶菌を阻害してはいないといえる。また、プロトプラストの保持という点からは、sucrose raffinose などの2糖類、3糖類を用いることが適当であった。以上の結果より、種々の浸透圧調整剤を用いて、プロトプラストの調製を行った結果を Table

3 にまとめ、その例を Fig. 5 に示した。火落菌のプロトプラストは、菌種によって使用できる浸透圧調整剤が異なっていたが、0.7 M sucrose が全般的に効果的であった。

要 約

1) 火落菌の種類を問わず溶菌できる条件を検討した結果、市販の細菌細胞壁溶解酵素である 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lysozyme, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *N*-acetylmuramidase SG, 2000 U/ml achromopeptidase を併用することにより、可能となった。

2) 火落菌の溶菌は、3種の酵素を組み合わせることによって行われるが、その溶菌の主体となる酵素は、火落性乳酸菌ホモ発酵型では NAM, 火落性乳酸菌ヘテロ発酵型では LYS, NAM, ACH, 真性火落菌ホモ発酵型では ACH, 真性火落菌ヘテロ発酵型では LYS, NAM のように菌のタイプによって異なっていた。

3) 火落菌は、対数増殖期より静止期の方が、細胞壁溶解酵素の作用を受けやすかった。

4) プロトプラスト調製に用いる浸透圧調整剤は、無機塩は酵素を阻害するため不適当であり、糖類、特に二糖類、三糖類および有機酸塩が適当であった。

終わりに臨み、終始ご指導下さいました当社常務取締役研究所長 布川弥太郎博士に、感謝致します。

なお、本研究の概要は、昭和63年度日本醸造学会大会において発表したものである。

文 献

- 1) Tanigawa, T., Umezu, M.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 31-40 (1979).
- 2) Uchida, K., Mogi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 233-249 (1973).
- 3) 友近謙一, 船橋達天, 永田哲英, 藤井高志, 金政泰弘: 日本細菌学雑誌, **38**, 777-785 (1982).
- 4) Kang, Y., Kim, J.H., Ryu, D.Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2221-2227 (1987).
- 5) Fujita, Y., Okamoto, T., Irie, R.: *Agric Biol. Chem.*, **47**, 2103-2105 (1983).
- 6) Momose, H., Yamanaka, E., Akiyama, H., Nosiro, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 179-185 (1974).
- 7) 原 昌道, 村上英也, 片桐 清, 大場俊輝: 醸協, **65**, 1007-1011 (1970).
- 8) 北原覚雄: 乳酸菌の研究, p. 167-184, 東京大学出版会 (1966)