

[J. Ferment. Technol., Vol. 53, No. 7, p. 429~434, 1975]

銅耐性酵母の分離とその菌体への取込みについて*

堀津 浩章・小川 清司・友枝 幹夫

岐阜大学農学部農芸化学科

Isolation of Cupric Acetate-Tolerant of Yeast and Incorporation of Cu^{2+} into the Cells of the Yeast

Hiroyuki Horitsu, Kiyoshi Ogawa, and Mikio Tomoyeda

Department of Agricultural Chemistry, Gifu University, Kagamigahara, Gifu

A strain of a cupric acetate-tolerant yeast, identified as *Candida sake*, was isolated from the activated sludge of a waste water plant.

Incorporation of Cu^{2+} into the cells of this strain was tested in a malt extract medium containing 100 ppm of Cu^{2+} . Results showed that the distribution ratio of Cu^{2+} incorporated into the cells is: 39.2% in the extractable fraction with 0.15 M NaCl solution containing 0.01 M ethylenediamine tetraacetic acid; 35.8% in the supernatant fraction by centrifugation at $26,000 \times g$ for 15 min, 16% in the cold 10% trichloroacetic acid extractable fraction and 9% in the hot 5% trichloroacetic acid extractable fraction.

緒 論

近年、銅化合物の需要が高まるとともに、その採掘、製錬をはじめ、いろいろの製造加工等にもなう廃水の処理が問題となってきた。すなわちその処理には主に化学的処理法が使用されているが、活性汚泥や散水汙床などの微生物処理法も考えられる。しかしこの微生物処理の場合考えなければならない問題の1つとして、銅化合物の微生物に対する影響がある。微生物に対する銅化合物の影響については、内貴ら¹⁾により *Saccharomyces ellipsoideus* をもちいて、その銅耐性機構が報告されているが、本報告では先ず銅耐性微生物のスクリーニングを行なった結果、活性汚泥中から特に銅耐性酵母が分離されたので、その酵母について同定を行うとともに、さらに本酵母について銅の取込みについても若干の実験を行なったので、その結果について報告する。

実 験 方 法

供試銅化合物 本報告の実験では酢酸銅を使用した。

銅耐性酵母の分離法 前報^{2~4)}で報告したように、いろいろの毒物耐性微生物分離源としては活性汚泥を用いるのが効果的であることが確かめられたので本研究でも銅耐性微生物分離源として活性汚泥を用いた。すなわち名古屋名城下水道処理場よりの活性汚泥を pH 6.0 に調整した 4% 麦芽エキスに酢酸銅を Cu^{2+} として 300~400 ppm 添加した後、500 ml の振盪フラスコに 100 ml 加え 28°C で14日間振盪培養（往復振盪、振幅 7 cm, 120 往復/毎分）を行なった。その間、時々顕微鏡観察により、そのマイクロフローを調べたところ、はじめのうちは、かび、酵母、細菌が混在していたが時間の経過とともに、pH の低下がみられ、かび、細菌の増殖がみられず、その代りに酵母の増殖がさかんとなった。そこでこの14日間振盪培養した培養液か

* 微生物による重金属化合物の回収に関する研究（第4報）
Studies on Recovery of Heavy Metal Compounds by Microorganisms (IV).

ら 10 ml をとり、新しく調整した同培地 90 ml に加え再び培養をつづけると、ほぼ酵母のみ増殖した。そこで得られた酵母を平板培養に移し、数回平板培養を繰返し純粋培養として分離した。

培養法 酵母の増殖培地としては 4 % 糖濃度の麦芽汁を基本培地とし、これに酢酸銅を添加した。実施に当っては、オートクレーブにて殺菌した麦芽汁に酢酸銅溶液をあらかじめ 70 % エタノールで殺菌した東洋科学製のポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターをとおして濾過したものを所定の濃度になるように添加した。培養法としては、あらかじめ酢酸銅無添加麦芽汁にて 28°C 、24 時間振盪培養した前培養液を 10,000 rpm、10 分間遠心分離後、得られた菌体を湿重量で 30 mg、本培養液に添加し、引つづき振盪培養した。

銅の定量法 銅の定量法⁵⁾としては、日立製作所製原子吸光装置 208 型を使用し、 $3247 \text{ \AA}$ の銅カソードランプで放電々流は 10 mA、使用フレームはアセチレン・空気による原子吸光法によった。なお測定に先だち試料は前報²⁾の方法で前処理した。

菌体量の測定 酵母菌体量は 660 nm における比濁法により測定した。

分離酵母の同定法 J. Lodder⁶⁾ の “The Yeasts” (1970) および飯塚・後藤⁷⁾ の「酵母の分類同定法」(1967)にもとづいて行なった。

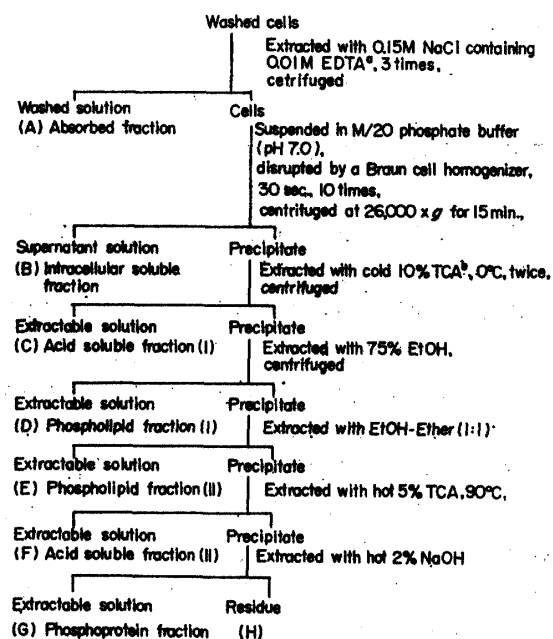


Fig. 1. Separation of the copper compound by Schneider's method.

^a Ethylenediamine tetraacetic acid

^b Trichloroacetic acid.

酵母菌体の破壊および銅化合物の分別定量法 菌体内へ取込まれた銅の分布をしらべるため Schneider 法⁵⁾にもとづき分別を試みた。その概要を Fig. 1 に示す。すなわち蒸留水にて洗浄した洗浄菌体をエチレンジアミン・四酢酸・二ソーダ塩 (0.01 M) を加えた食塩水 (0.15 M) にて 3 回抽出することにより菌体に吸着された区分 (A) と菌体区分に分けた。次いで菌体区分は磷酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.0) に懸濁させ、ガラスビーズ ($0.45 \text{ mm}\phi$) 存在下で Braun cell homogenizer にて菌体を破壊した。次いで $26,000 \times g$ 、15 分間遠心分離、上清区分 (B) と沈澱区分に分け、沈澱区分は三塩化酢酸溶液 (10%) にて 0°C で攪拌抽出、遠心分離し比較的高分子化合物を含む酸可溶区分 (C) と沈澱区分に分け、沈澱区分は次いで 75 % エタノールにて抽出、75 % エタノール可溶磷脂質区分 (D) を分画し、更にエタノール・エーテル可溶磷脂質区分 (E) を分画し、沈澱区分を 5 % 三塩化酢酸熱溶液で抽出し酸可溶区分 (F) を分画した後、その沈澱区分を 2 % 熱苛性ソーダにて抽出、磷脂蛋白区分 (G) を分画した。次いで各区分についてそれぞれ銅含量を原子吸光法により定量した。

実験結果および考察

活性汚泥より分離された銅耐性酵母 A 株を仮りに酵母 A 株と名づける。

酵母 A 株の分類学的性質について 酵母 A 株について分類、同定するためにその性質を検討した。

酵母 A 株の形態的および生理的性質 純粋分離された酵母 A 株について 4 % 麦芽汁培地で 28°C で 72 時間培養した際の顕微鏡写真を示す (Fig. 2)。酵母 A 株の細胞は球形又は卵形を呈する。出芽方向については、その培養観察より multilateral budding によることがまとめられた。次に slide culture の結果を示す

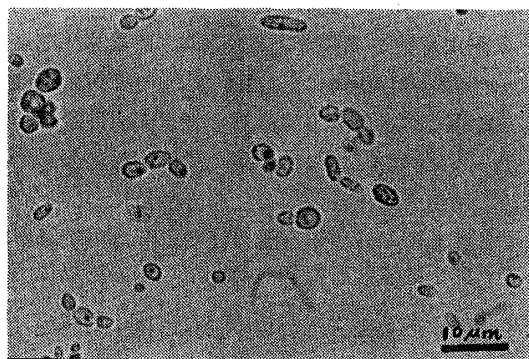


Fig. 2. Micrograph of the isolated strain of yeast, *Candida sake A*.

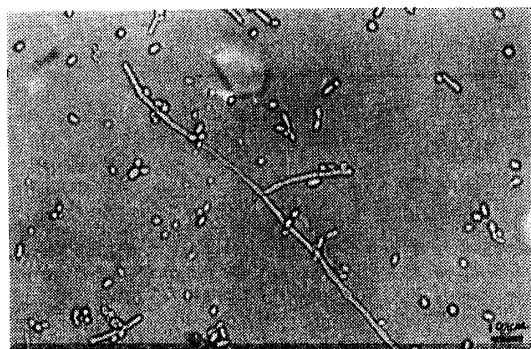


Fig. 3. Micrograph of pseudomycelia formation by the isolated strain of yeast, *Candida sake A*.

(Fig. 3). 酵母 A 株は Pseudomycelium を形成することがみとめられる。なお酵母 A 株の形態的および生理的性質を要約する (Table 1)。また酵母 A 株分離に際し、その特徴として培養開始時の pH を低下することにより純粋分離が容易となったことは酵母 A 株がかなり pH の低いところで増殖するものと考えられるので、この点について若干検討した結果を示す (Table 2)。酵母 A 株は pH 2.0 でも発育出来ることがみとめられる。また酵母 A 株は滲透圧に対してかなり耐性を有することがみとめられた (Table 3)。

以上の形態的及び生理的性質を検討した結果、酵母 A 株は *Candida sake* に属することがみとめられた。以後酵母 A 株を *Candida sake A* 株と命名する。

Candida sake A 株の銅耐性について *Candida sake A* 株についてその銅耐性試験を行なった結果、酢酸銅では 800 ppm まで、また硫酸銅については 500 ppm であった (Table 4)。なお保存標準株中の *Saccharomyces ellipsoideus* AHU 3078 株および *Candida utilis*

Table 1. Morphological and physiological characters of the isolated strain of yeast, *Candida sake A*.

A. Morphological characters

1. Shape: globose to short-ovoid
2. Size: 1.5 to 2.3 by 4.0 to 7.0 μm
3. Ascospore formation: negative
4. Pellicle formation: islets to fine pellicle
5. Pseudomycelia formation: positive

B. Physiological characters

1. Fermentation of carbohydrates
D-glucose, D-galactose, maltose, sucrose: positive
lactose, raffinose, D-xylose, L-arabinose: negative
2. Assimilation of carbohydrates
D-glucose, D-galactose, maltose, sucrose: positive
lactose, raffinose: negative
3. Acid production: positive
4. Ethanol assimilation: positive
5. Methanol assimilation: negative
6. Nitrate assimilation: negative
7. Splitting of arbutin: positive
8. Vitamin requirement: biotin (stimulative)
9. NaCl-tolerance (w/v): 10%
10. Gelatin liquefaction: negative
11. Urease activity: negative
12. Litmus milk reaction: negative

AHU 3210 株についても同様に耐性試験を行なった結果、酢酸銅 100 ppm 存在下ではいずれも増殖がみとめられなかった。

Table 2. Effect of pH on growth, gas formation and pellicle formation.

pH	Growth ^{a)}		Gas formation ^{b)}		Pellicle formation ^{c)} 72 hr
	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	
1.5	—	—	—	—	—
2.0	±	+	—	—	—
3.0	+	+	—	—	—
4.0	+	+	+	+	±
5.0	+	+	+	+	+

Candida sake A was cultivated with a 4% malt extract medium at the pHs indicated in the table by keeping it at 28°C.

^{a)} Growth: —, no growth; ±, scanty growth; and +, good growth.

^{b)} Gas formation: —, not formed; and +, formed.

^{c)} Pellicle formation: —, not formed; ±, scanty formed; and +, well formed.

Table 3. Effect of osmotic pressure due to the NaCl concentration on growth, gas formation and pellicle formation.

Conc. of NaCl (%)	Growth ^{a)}		Gas formation ^{b)}		Pellicle formation ^{c)} 72 hr
	24 hr	72 hr	24 hr	72 hr	
1	+	+	+	+	+
2	+	+	±	+	+
3	+	+	—	+	+
6	+	+	—	±	+
9	±	+	—	+	+
12	±	±	—	—	—
15	—	—	—	—	—

Candida sake A was cultivated with a 4% malt extract medium in the presence of NaCl concentration indicated in the table by keeping it at 28°C.

^{a)} Growth: —, no growth; ±, scanty growth; and +, good growth.

^{b)} Gas formation: —, not formed; ±, scantily formed; and +, well formed.

^{c)} Pellicle formation: —, not formed; and +, well formed.

Table 4. Tolerance of *Candida sake A* for copper compounds.

Cu-compound	Conc. of Cu ²⁺ (ppm)	Growth ^{a)}		
		24 hr	48 hr	72 hr
Cu-acetate	500	+	+	+
	800	—	+	+
	1000	—	—	+
Cu-sulfate	500	±	±	±
	800	—	—	—
	1000	—	—	—

Candida sake A cells were cultivated at 28°C in a 4% malt agar slant which contained Cu²⁺ compounds at the concentrations indicated in the table.

^{a)} Growth: —, no growth; ±, scanty growth; and +, good growth.

Table 5. Effect of the initial pH values of a medium containing Cu-acetate (100 ppm as Cu²⁺) on the amount of Cu²⁺ incorporation into the cells.

pH	Dry weight of cells (mg)	Cu ²⁺ incorporated into the cells (mg)	Incorporation efficiency*
4.0	191	2.24	11.7
5.0	300	3.06	10.2
6.0	293	3.50	11.9
7.0	265	3.20	12.1

* Incorporation efficiency = $\frac{\text{Cu}^{2+} \text{ incorporated into cells (mg)}}{\text{Dry weight of cells (g)}} \times 100$

Candida sake A cells (initial, 30 mg wet weight) were cultivated in a 500 ml shaking flask containing 100 ml of a 4% malt extract medium in the presence of Cu²⁺, 100 ppm, at 28°C for 72 hr.

Table 6. Distribution of the Cu^{2+} taken up by the cells.

Fraction	Cu^{2+} taken up by the cells (mg)	Incorporation efficiency	Distribution ratio (%)
(A) Absorbed	1.05	4.28	39.2
(B) Intracellular soluble	0.96	3.92	35.8
(C) Acid soluble (I)	0.43	1.75	16.0
(D) Phospholipid (I)	0	0	0
(E) Phospholipid (II)	0	0	0
(F) Acid soluble (II)	0.24	0.98	9.0
(G) Phosphoprotein	0	0	0
(H) Residue	0	0	0

Candida sake A cells (initially 30 mg wet weight) were cultivated in a 500 ml shaking flask containing 100 ml of a 4% malt extract medium in the presence of Cu^{2+} , 100 ppm at 28°C for 72 hr. The broth was centrifuged at $7,500 \times g$ for 10 min. The cells obtained were washed with distilled water, 3 times, and centrifuged to separate them. They were then extracted with 0.15 M NaCl containing 0.01 M EDTA, 3 times and centrifuged. The cells obtained were disrupted with a Braun cell homogenizer under the conditions described in the text. Further fractionation of the homogenate into each fraction was carried out as described in the text.

Candida sake A 株による銅の菌体への取込み

銅取込みに際し、培地の初発 pH が菌体量および取込み効率に対し如何なる影響をおよぼすかを 100 ppm Cu^{2+} を添加培地を用いて検討した結果、pH 4.0 から 7.0 の範囲でよく増殖し、取込み効率についてもほとんど影響しないことがみとめられた (Table 5).

菌体に取込まれた銅の分布 菌体を Braun cell homogenizer にて破壊した後、Fig. 2 に従ってそれぞれの分画区分に取込まれた銅の量を定量した結果を示す (Table 6). 本表よりわかるように銅は菌体表層に 39.2% 吸着されるが、菌体内に取込まれたものについては Schneider 法により、その取込まれた区分を検討した結果、35.8% が菌体内の可溶区分に取込まれており、また 16% が菌体内の酸可溶のやや高分子物質区分にみられる。また (F) のようなやや低分子物質区分に 9% 取込まれる。しかし phospholipid や phosphoprotein 区分更には不溶性区分には取込まれていないことがみとめられ、銅の取込み区分については選択性がみられた。

以上 *Candida sake* A 株における銅取込みおよび耐性機構について考察すると Table 5 および 6 の結果から *Candida sake* A 株では培地に 100 ppm の Cu^{2+} を添加培養した際、その約 30% が菌体に吸着ないしは取込まれており、そのうち吸着量は、39.2%、菌体内取込み量は 60.8% であった。なお内貴⁹⁾ および芦田¹⁰⁾ による銅

耐性酵母では硫化水素発生にもとづき添加銅が硫化銅となることにより耐性機構を説明しているが、*Candida sake* A 株では特別、菌体外に硫化銅にもとづく黒色化もみられず、上述の耐性機構とは別のものと考えられる。なお銅に対するその他の耐性機構としては、Woolfolk¹¹⁾ により *M. lactilyticus* をもちいてヒドロゲナーゼによる Cu^{2+} から Cu^{1+} への還元機構が報告されているが、*Candida sake* A 株の耐性機構については更に詳しく検討したい考えである。

要 約

活性汚泥中より、銅耐性酵母 *Candida sake* A 株を分離し、同定した。*Candida sake* A 株は麦芽エキス 3 日間培養で培地添加 Cu^{2+} の約 30% を吸着ないし取込み、そのうち 39.2% は吸着区分に、35.8% は菌体破壊後、 $26,000 \times g$, 15 分間での上清区分に、16% は酸可溶高分子物質区分に、そして 9% は酸可溶低分子物質区分に見出された。

終りに臨み、活性汚泥の試料を提供して下さいました、名古屋市中心下水道処理場の藤田利彦技官に対し、また標準菌株を分譲いただいた北海道大学農学部農芸化学科、高尾彰一教授に対し厚く感謝する。なお本研究の一部は昭和 48 年 4 月 4 日、日本農芸化学会大会において発表した。

文 献

- 1) Naiki, N., Minagawa, T., Arakatsu, Y., Ashida, J.: *Memoirs Coll. Sci., Univ. Kyoto, Ser. B*, **21**,

- 87 (1954).
- 2) 友枝, 堀津, 口丸: 農化, **47**, 45 (1973).
- 3) 友枝, 堀津, 東: 農化, **47**, 51 (1973).
- 4) 堀津, 前田, 友枝: 醸工, **52**, 15 (1974).
- 5) 武内, 鈴木: 原子吸光分光分析, 南江堂 (1967).
- 6) Lodder, J. (ed.): *The Yeasts, a taxonomic study*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1970).
- 7) 飯塚, 後藤: 酵母の分類同定法, 東大出版会 (1969).
- 8) Schneider, W. C.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945).
- 9) Naiki, N.: *Memoirs Coll .Sci., Univ. Kyoto, Ser. B*, **24**, (3), 243 (1957).
- 10) Ashida, J.: *Annual Review of Phytopath.*, **3**, 153 (1965).
- 11) Woolfolk, C. A., Whiteley, H. R.: *J. Bacteriol.*, **84**, 647 (1962).

(昭50. 2. 6 受付)