

【135】

氏 名	角 野 一 成
	すみ の かず しげ
学 位 の 種 類	工 学 博 士
学 位 記 番 号	工 博 第 179 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 44 年 9 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	工 学 研 究 科 工 業 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	清酒酵母の生理的研究 —乳酸存在下の清酒酵母の生理について

論文調査委員 (主 査) 教 授 福 井 三 郎 教 授 宍 戸 圭 一 教 授 野 崎 一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、清酒醸造における酒母製造工程を省略し、代りに純粋培養酵母を使用する「酒母省略仕込み法」を開発するための基礎的知見を集積する目的で行なった研究結果を3編16章にまとめたものである。

研究内容は主として二つに大別され、まず酒母酵母の性質、とくに酒母中に存在し雑菌防止の役割を果たすものとされている乳酸の酵母に与える影響を詳細に調べており、つぎに酒母酵母の代りに使用する乳酸添加通気培養酵母の性質を明らかにしている。

第1編と第2編では、合成培地に乳酸を1～1.5%程度の濃度に添加して静置培養した場合に観察される菌体の凝集とそれに続く死滅現象を細胞化学および酵素化学的に研究している。

第1編は酵母菌体の凝集に伴ってチトクロームc、コエンチームA、NAD、FADなどの補酵素が顕著に減少することを示し、この減少がある種の酵母のイノシトール欠乏時に起る現象と類似している点から乳酸が清酒酵母におけるイノシトール生合成、遊離イノシトールの生体内活性型イノシトールへの転換、またはイノシトールの関与する代謝を阻害する可能性を検討している。

清酒酵母は通常イノシトールを必須発育因子としないが、乳酸を含有する合地培地ではイノシトール添加により増殖速度が著しく促進された。しかし増殖後凝集の起っている菌体のイノシトール生合成能、脂質結合型イノシトールの含量と分布、イノシトール・リン脂質と他のリン脂質の組成比などを調べたが正常な菌体に比較して差異が認められなかった。またイノシトール欠乏酵母に見られる細胞壁のグルカン対マンナンの比率の増大も証明されなかった。これらの事実から乳酸の存在時には、酵母の出芽、分裂、菌体の生育はなんらかの機構により阻害され、この段階では外部よりのイノシトール添加が必要であるが、発育の終わった菌体の凝集を伴う死滅にはイノシトールは直接の関連がなく他の原因を検索する必要があると結論している。なお上記の現象は培養温度が20℃以下で種々の天然栄養素の共存する場合には起りにくいことも観察し、実地の酒母工程において弱い細胞のみが死滅し健全な細胞が生存する事実に示唆を与えている。

第2編は乳酸による酵母細胞の凝集と死滅の原因を種々の面から追求している。すなわち第1章では凝集が乳酸含有培地の物理化学的な性質によるものでなく、乳酸存在下に生育した菌体に特有の性質であることを沈降法を用いて確認し、第2章では界面電気化学的方法により、この凝集の原因が酵母細胞膜成分の変化に基づく細胞の表面電荷の異常によるものでないことを示した。

第3章では各種菌体成分のうち、糖質、タン白質、核酸および脂質などの生体高分子の含量にたいしては乳酸の影響がなく、ある種の補酵素とくにヌクレオチド構造のものの含量が乳酸添加培養後期に急激に減少することを認めた。第4章では静置培養時の乳酸の代謝により凝集死滅の原因となる異常物質が生成するものでないことを、 ^{14}C で標識した乳酸を用いて確かめた。

第5章では酵母の生理活性を表わす基本的尺度として酸素吸収能 (QO_2) 炭酸ガス発生能 (QCO_2) を採用し、乳酸添加培養時には対数増殖期の後期から定常期初期にかけて急激に QO_2 , QCO_2 が消失することを認め、これが酵母死滅に附随もしくは先行する現象であるとした。この場合の乳酸濃度、pH、温度、時間などは微生物の生理的条件内で起こることも認められた。

第6章ではブドウ糖などの被醗酵性糖類の共存が乳酸の作用から酵母を保護することを示した。しかも、この保護効果の発現には、糖が定常的に代謝されることが必須の条件であることから、その保護機構として「(1)解糖によって生じるエネルギーが有効 (2)解糖の中間体が乳酸による酵素の不活性化を緩和する」の二つの仮定を提示した。前者の仮定については、エネルギー代謝系の阻害剤を用いた生細胞実験から否定的結論が得られたが、後者については肯定的な事実が認められた。

第7章で乳酸存在時の凝集から死滅に至る酵母中の解糖系に属する諸酵素は同じように不活性化されており、その原因が主として菌体内 pH の低下によるものと判断される結果が得られた。解糖系の代表的な酵素として選んだヘキソキナーゼの不活化にたいする乳酸濃度、接触温度と時間、ブドウ糖共存による保護効果などを調べて、生菌のガス代謝能の場合に対応することを認めた。以上の事実から静置培養時の乳酸の作用が、菌体内へ取りこまれて内部の pH を低下させるために酵素が不活化されるものと推定し、種々の酸について調べた結果乳酸以外に蟻酸の阻害作用が強く、生細胞へ取りこまれにくい鉍酸やある種の有機酸、または容易に代謝される TCA サイクル系の酸は乳酸に見られる型式の阻害を起こさないことがわかった。

第8章では以上の諸現象をまとめて、合成培地と酒母工程における乳酸の酵母細胞に与える影響の差異について論述し、酒母酵母は低温と天然栄養物質の共存により軽減された乳酸の影響を受けて、普通酵母よりも強健な生理活性を獲得していると結論した。

第3編は「酒母省略仕込み法」に使用するために清酒酵母を乳酸含有培地に通気培養した場合、増殖および生成した菌の生理に及ぼす乳酸の影響を調べたものである。

第1章で、通気培養では嫌気培養とは異なり、酵母の増殖が糖酒と乳酸を2段に消費して増殖し、得られた菌体の呼吸系補酵素類や各種のビタミン含量はブドウ糖のみで生育したものよりも多く、従って呼吸能も相当に強くなっていることを示した。

第2章では、とくにチトクローム c の増加に着目して生産条件を検討した。乳酸含有培地に通気培養した清酒酵母は2段増殖をするが、菌体内チトクローム c 含量は糖と乳酸の消費のそれぞれの対数増殖期中

期に一過的に増大し、後者で最高値に達することが認められた。チトクローム c の生産のためには 2 段目の増殖に際して乳酸をくり返し添加して培地の乳酸濃度を約 1% 以下に保つことにより、チトクローム c 生成量を高水準に維持しうることを示した。

第 3 章では乳酸の好氣的代謝の場合のチトクローム c 含量増大の機作を調べた。好氣条件下、乳酸の存在により清酒酵母の乳酸酸化系は増強されるが他の基質の酸化系には影響を与えなかった。とくに乳酸を酸化し、その電子をチトクローム c に渡す D—および L—Lactate : ferricytochrome c oxidoreductase (LCR) (EC. 1.1.2.3 および 1.1.2.4) と 5—アミノレブリン酸合成酵素とが乳酸によって著しく強められ「誘導生成」と規定することのできる現象であることが示された。後者はチトクローム c のヘム部の合成に関与する重要な酵素であり、この活性が強くなることが直接チトクローム c 含量の増大に関連するとともに、LCR の増加も間接的効果を与えるものであることを推定した。結論では本研究で得られた事実を整理し、学術的および工業的意義について論及している。

論文審査の結果の要旨

日本酒の醸造は糖化とアルコール醗酵とが同時に営まれる「並行複醗酵」を開放容器中で行なわせて、生成するアルコール濃度を 22% 程度に達せしめる世界に例を見ない方式を採用している。従って清酒酵母は特異な性質を持つものと考えられ、とくに酒母工程の間に 1% 前後存在する乳酸の作用を受けて弱い細胞は他の雑菌とともに淘汰され、生き残った細胞は強い生理活性を獲得するとされている。

この論文の内容は、清酒醸造における酒母工程を省略し、その代りに純粋培養酵母を使用する「酒母省略仕込み法」を開発するために行なった基礎研究をまとめたもので、酒母酵母の性質、とくに乳酸が酵母に与える影響を細胞化学および酵素化学的方法で詳細に調べた部分と、酒母酵母の代りに使用する乳酸添加通気培養酵母の性質、とくに代表的な呼吸系補酵素のチトクローム c 含量の増大について検討した部分より成っている。

この研究で得られた成果を以下に列挙する。

1. 乳酸を 1% 程度含有する合成培地に 25°C 以上の温度で培養した場合、必須発育因子であるパントテン酸以外にイノシトールなどの栄養因子の要求性が厳密となり増殖速度が著しく低下することと、生育することのできた細胞の大部分が凝集しコエンチム A, FAD, NAD, チトクローム c などの呼吸系補酵素の含量が著しく少なく、速やかに死滅することを観察した。

2. 上記の現象はイノシトールを必須因子として要求する酵母がイノシトール不足時に示す状態と類似していることから、凝集菌体のイノシトール生合成能、イノシトール・リン脂質の含量および他のリン脂質との組成比、イノシトールの関与するとされている細胞壁のグルカンとマンナンの比率にたいする乳酸の影響を調べたが、生育した菌体の凝集死滅現象における乳酸とイノシトールの直接的な関連は否定された。また界面電気化学的方法により凝集の原因が酵母細胞膜成分の変化に基づく細胞表面の電荷の変化によるものでないことを確かめた。

3. 嫌気下で乳酸と接触させることにより、清酒酵母の呼吸能と醗酵能が急速に消失し死滅に至ることを証明した。この場合、解糖系をはじめとする各種の代謝に関与する酵素のうち低い pH に弱いものが急

速に失活することを細胞内 (in vivo) および試験管内 (in vitro) の実験で確認した。

4. 上記の凝集死滅現象は実地の酒母工程におけるような低温で天然栄養因子の共存する場合には起り難いことを示し、また、ブドウ糖が共存することによっても軽減されることを明らかにした。この事実は酒母工程では弱い細胞のみが乳酸により淘汰されることを示唆するものである。

5. 解糖系の代表的酵素としてヘキソキナーゼを選んで、その不活性化にたいする pH、乳酸濃度、時間、温度およびブドウ糖共存の影響を調べて、生細胞の場合と対応する結果を得た。

6. 種々の酸類の作用を比較し、乳酸と蟻酸が特異的な阻害効果を表わし、生細胞内に取りこまれない鉍酸や有機酸、または容易に代謝される TCA サイクルの酸では乳酸のような作用を起こさないことを示した。また ^{14}C で標識した乳酸を用いて、菌体間への取りこみと分解過程を追跡した。これらの結果から、乳酸含有培地に静置した場合乳酸が菌体内へ取りこまれて菌体内の pH を下げるために解糖系をはじめとする酵素群が不活化され呼吸系補酵素の生合成も阻害され細胞分裂機能も低下し、出芽と分離が不均衡となって凝集・死滅が起こるものと結論した。

7. 乳酸添加培地に好気培養した場合は嫌気培養とは逆に各種の補酵素含量が高く呼吸能のきわめて旺盛な菌体が得られることを発見した。この条件下、酵母は糖と乳酸を順次消費して2段増殖をし、呼吸系補酵素とくにチトクローム c 含量はそれぞれの対数増殖期中期前後に一過的に最高点に達することを認めた。この現象に着目して糖質培地に乳酸を適宜添加しながら通気培養することにより培養物 1 l 当り 10 mg 以上のチトクローム c の生産に成功した。

8. 上記のチトクローム c 生成の増大の原因を追求して、好気下乳酸が D—および L—Lactate : ferricytochrome c oxidoreductase と 5—アミノレブリン酸合成酵素を誘導生成するためであることを明らかにした。

なお乳酸含有培地に通気培養して得られた生理活性の強い菌体を用いて清酒醸造が順調に行なわれることも述べた。

以上を要するに、この研究は乳酸が嫌気状態および好気状態で清酒酵母に与える効果を、多彩な方法で詳細に研究し、いくつかの新事実を発見したものであり、「酒母省略仕込み」清酒醸造法の基礎を与えるとともに、チトクローム c の新生産方式を開発した点で学術上・工業上寄与するところが少なくない。

よって本論文は工学博士の学位論文として価値あるものと認める。