

酵母のリンゴ酸生成に関連する酵素の 活性に及ぼす培養条件の影響

松田章* 中村静夫** 澤野礼奈*** 矢野俊博***

緒言

清酒中には約40種類もの有機酸が含まれている。中でも、コハク酸、乳酸、リンゴ酸は清酒中の主な酸で、約80%を占める。有機酸の生成は主として酵母の働きによるものであり、酵母ミトコンドリア内のTCA回路での酸化的反応、還元的反応、プリン合成系、さらにはグリオキシル酸回路による生成等が報告されている。しかしその生成機構については、酵母ミトコンドリアのTCA回路以外の系も提唱されつつあるが、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、酵母のリンゴ酸生成機構の解明へのアプローチとして、リンゴ酸高生成タイプを含む4種類の酵母を対象に、リンゴ酸生成に関連する酵素活性に及ぼす培養法の影響について検討を行った。

実験方法

表1 酵母の培養条件

培養の種類	培地	容量 (mL)	接種量 (μ L)	温度 ($^{\circ}$ C)	振盪速度 (rpm)	時間 (hr)
静置培養	YM-5	200	1000		—	24
静置(軟寒天)培養	YM-5+agar 0.15%	200	1000	30	—	24
振盪培養	YM-5	200	100		120	16
振盪(バッフル)培養	YM-5	100	50		120	16

各培養には300mLの三角フラスコを使用
振盪(バッフル)培養では、バッフル付フラスコを使用

1. 供試菌株、使用培地及び培養方法

清酒用きょうかい酵母701号(K-701)及びきょうかい酵母901号(K-901)と、石川県工業試験場で選抜した2株のリンゴ酸高生成酵母、MT-K1401-8(シクロヘキシミド耐性酵母)及びFKW-A245(細胞融合株K-901 \times OC-2)

の計4株を使用した。酵母は、5mLのYM-5培地(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, polypeptone 0.5%, glucose 5%)で1日間、前培養した後、表1に示した嫌気的条件下(静置培養、静置(軟寒天)培養(以後、軟寒天培養))及び好気的条件下(振盪培養、振盪(バッフル)培養(以後、バッフル培養))で本培養を行った。中でも軟寒天培養は培地に寒天を加えることで、嫌気の状態でありながら培地全体で酵母が増殖する培養法であり、清酒醸造時の清酒醪と類似した環境、すなわち清酒醪全体で酵母が増殖している環境となるように設定した。

2. ミトコンドリア画分、細胞質画分の調製

ミトコンドリア画分の調製は、表1に示す各培養液から遠心分離で得た酵母菌体に、最終濃度が1Mソルビトール、50mM KPB(pH7.5)、20mM 2-mercaptoethanol、6units/mL Zymolyase-20Tとなるように水を加えて(全量10mL)、35 $^{\circ}$ Cで120分間プロトプラスト化を行った。集菌した菌体を氷冷しながら2分間超音波処理を行い、遠心分離(2500g \times 10分、4 $^{\circ}$ C)で細胞片等を除去し、その上清を遠心分離(27000g \times 20分、4 $^{\circ}$ C)した。この沈殿部分に1M SP-Buffer 1mlを加えて溶解させ、不溶部分を除去(1080g \times 5分、4 $^{\circ}$ C)し、得られた上清をミトコンドリア画分(粗酵素液)とした。また、細胞質画分の調製は、集菌した酵母菌体を50mM KPB(pH7.0)中でビーズ破砕機を用いて1分間の破砕処理及び2分間の氷水冷却を繰り返し、計4分間の破砕処理を行った。処理後遠心(12000g \times 10分)し、上清を細胞質画分(粗酵素液)とした。

3. 酵素活性測定及び分析

活性を測定する酵素は、ミトコンドリアの標識酵素であるチトクロームCオキシダーゼ(CCOx)、有機酸生成に関与するTCA回路に存在する5種の酵素(リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(MDH)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(ICDH)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)、コハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH)、イソクエン酸リアーゼ(ICL))とした。なお、酵素活性1unitは1分間あたり、各基質あるいは補酵素等の変化量(1nmol)とし、比活性はタンパク質1mgあたりとした。タンパク質の定量は、Bradford法(Bio-Rad, Quick Startプロテインアッセイ)、有機酸量は有機酸分析計(日本ダイオネクス(株)・ICS-1500、カラム: IonPac ICE-AS6)により分析した。

*化学食品部 **九谷焼技術センター ***石川県立大学

実験結果

ミトコンドリア，細胞質の酵素活性

MT-K1401-8のミトコンドリア画分及び細胞質画分における酵素の比活性の結果をそれぞれ図1に示した。ミトコンドリア画分のMDH活性は、静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ1605 units/mg, 1375 units/mgで、振盪培養、バツフル培養の各比活性よりも約3.5倍以上高くなった。また、細胞質画分ではミ

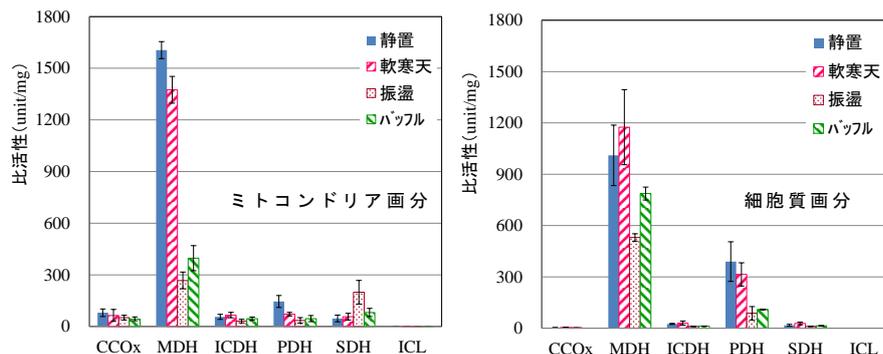


図1 MT-K1401-8の各酵素の比活性

トコンドリア画分と同様、静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ1010 units/mg, 1175 units/mgで、振盪培養、バツフル培養での各比活性よりも約1.7倍高くなった。K701と比べると、静置培養、軟寒天培養のミトコンドリア画分で約2倍の比活性を示した。SDH活性は、振盪培養、バツフル培養のミトコンドリア画分でのみ、また、PDH活性は静置培養、軟寒天培養の細胞質画分でのみ比較的高かったが、これらはK701と同程度であった。

K-701, K-901のMDHの比活性は、すべての培養法で細胞質画分の方がミトコンドリア画分よりも1.15~1.69倍, 1.04~1.48倍それぞれ高かった。これに対して、MT-K1401-8及びFKW-A245のMDHの比活性は、静置及び軟寒天培養では細胞質画分よりもミトコンドリア画分の方が高く、振盪及びバツフル培養ではその逆であった。

リンゴ酸生成量は、すべての酵母で静置培養及び軟寒天培養の方が振盪培養及びバツフル培養よりも著しく高かった。また、菌株間では、K-701, K901は同じ培養法で同程度のMDH活性と同程度のリンゴ酸生成量を示し、4種の酵母菌株の中ではリンゴ酸高生成酵母であるMT-K1401-8のMDH活性が最も高く、リンゴ酸の生成量も最も高い値を示した。しかし、FKW-A245では、リンゴ酸生成量がMT-K1401-8に次いで高い値を示したにもかかわらず、MDH比活性は4株中で最も低い値を示し、TCA回路やMDH以外のリンゴ酸生成経路が存在する可能性が考えられた。一方、同じ培養法で細胞質のMDH活性は、K-701, K901及びMT-K1401-8では同程度の値を示した。MT-K1401-8では、MDH以外のICDH, SDH, ICLの活性はK-701やK-901と比較して大差はなかった。これらのことから、嫌気的条件下では、酵母の細胞質、ミトコンドリア両画分のMDH活性が好気的条件下よりも高まり、特にMT-K1401-8では、ミトコンドリア画分のMDH活性がK-701, K-901以上に高まっていることが明らかとなった。

以上のことから、MT-K1401-8のリンゴ酸生成は、ミトコンドリアの還元的反応(MDHにより促進される経路の活性化)による影響が大きいものと推定される。

結言

- (1)培養法の違いでは、すべての酵母(ミトコンドリア、細胞質の両画分)について、好気的条件(振盪培養、バツフル培養)よりも嫌気的条件(静置培養、軟寒天培養)で、リンゴ酸の高生成及びMDHの高活性が見られた。
- (2)酵母の違いでは、K-701, K-901のMDHの比活性は、すべての培養法でミトコンドリア画分よりも細胞質画分の方が高かった。これに対し、MT-K1401-8, FKW-A245では、静置培養及び軟寒天培養で細胞質よりもミトコンドリア画分の方が高く、逆に振盪培養及びバツフル培養ではミトコンドリアよりも細胞質画分の方が高かった。
- (3)培養条件の違いでは、好気的条件下ではTCA回路の酸化的反応の促進に伴いリンゴ酸が減少し、嫌気的条件下ではTCA回路の還元的反応、及び細胞質のMDHを介する経路の活性化によりリンゴ酸が増大したと考えられる。
- (4)リンゴ酸高生成酵母MT-K1401-8が最多のリンゴ酸生成を示すメカニズムとして、嫌気的条件下でのMDHの活性化に加え、特にきょうかい酵母に比べてミトコンドリア画分でのMDHが活性化していることによるところが大きいものと考えられる。

論文投稿

日本醸造協会誌 2014, vol.109, no.10, p.745-755.