



Title	清酒醸造における生酏仕込の特性要因に関する研究
Author(s)	溝口, 晴彦
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3144163">https://doi.org/10.11501/3144163</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

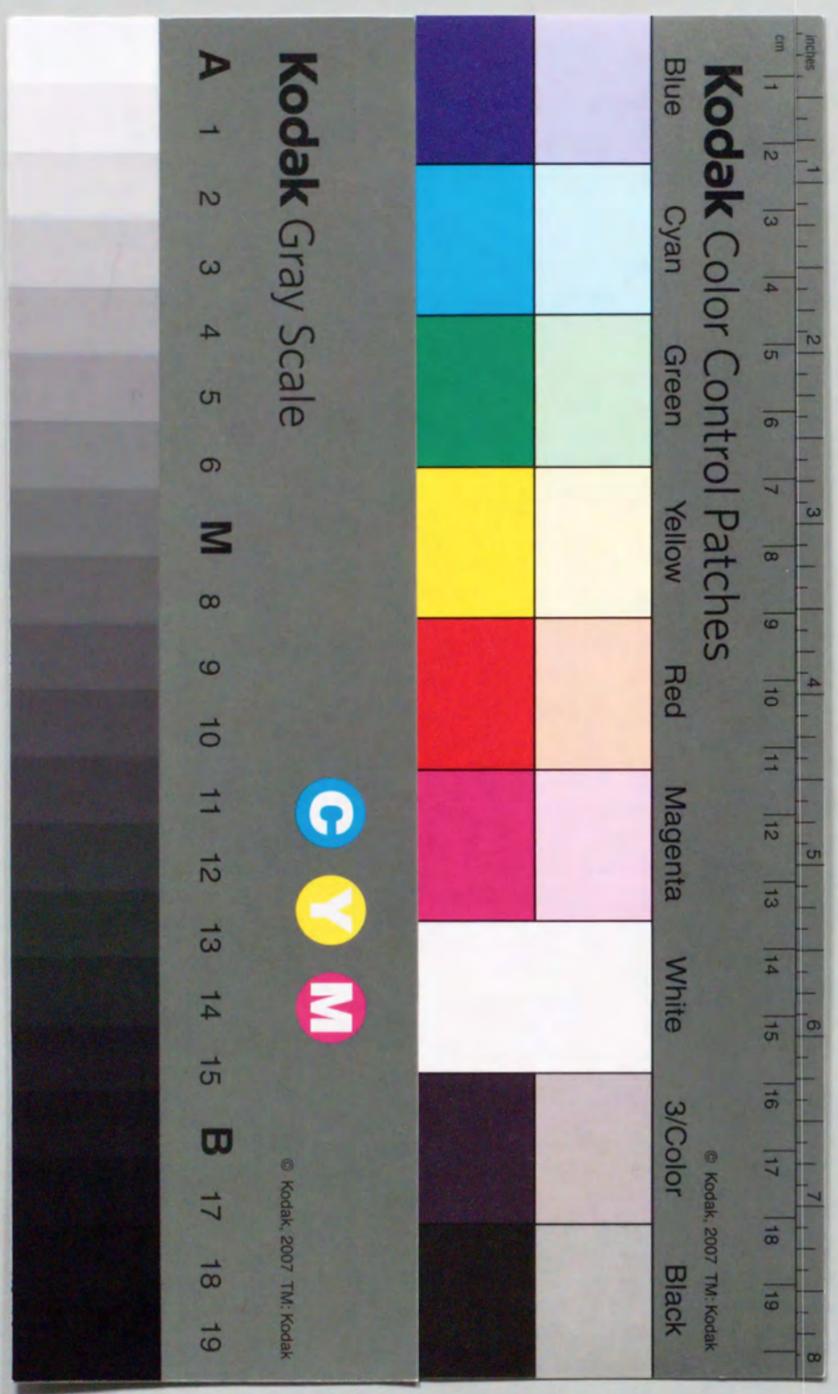
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

清酒醸造における生酏仕込の  
特性要因に関する研究

1997年

溝口晴彦



①

清酒醸造における生酏仕込の  
特性要因に関する研究

1997年

溝口晴彦

目次

緒論	5
第1章 酒母および醪中の酵母のリン脂質脂肪酸組成	8
第1節 緒言	8
第2節 実験方法	8
第3節 実験結果	11
第1項 酒母における酵母のリン脂質脂肪酸組成	11
第2項 酵母のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす乳酸菌の影響	14
第3項 乳酸菌の増殖に及ぼすリノール酸の影響	16
第4項 清酒醪における酵母のリン脂質組成	17
第5項 PC/PE比に及ぼすリノール酸の影響	18
第6項 清酒醪の酵母の脂質組成と 菌体内トリグリセリドの分解利用	22
第7項 エタノール存在下に増殖することの影響	26
第4節 考察	29
第5節 要約	31
第2章 生醗酵母の特性に及ぼすリン脂質脂肪酸の影響	33
第1節 緒言	33
第2節 実験方法	33
第3節 実験結果	35
第1項 温み取り耐性に及ぼす脂肪酸の影響	35
第2項 温み取りによって誘導されるエタノール耐性	39

第3項	生醗酵母の長期保存性	4 2
第4項	発酵力に及ぼす脂肪酸の影響	4 3
第5項	エタノール耐性に及ぼす脂肪酸の影響	4 4
第4節	考察	4 6
第5節	要約	4 8
第3章	膜のバリアー能に及ぼすリン脂質脂肪酸の不飽和度の影響	5 0
第1節	緒言	5 0
第2節	実験方法	5 0
第3節	実験結果及び考察	5 2
第1項	リポソームのバリアー能に及ぼす リン脂質アシル基の飽和度の影響	5 2
第2項	細胞膜透過係数に及ぼす脂肪酸の影響	5 6
第3項	エタノール存在下での増殖により誘導される 酵母細胞ののエタノール耐性	6 2
第4項	エタノール存在下に増殖することにより 誘導される酵母細胞のバリアー能	6 4
第4節	要約	6 7
第4章	乳酸菌による蒸し米溶解促進と作用因子の分画	6 9
第1節	緒言	6 9
第2節	実験方法	6 9
第3節	実験結果	7 2
第1項	$\alpha$ 化米溶解に及ぼす死滅菌体懸濁液の効果	7 2
第2項	種々の菌株による溶解促進作用	7 3

第3項	分画液の溶解に及ぼす添加効果	7 4
第4項	分画成分の化学分析	7 5
第5項	可溶化細胞壁の添加効果	7 6
第6項	テイコ酸の添加効果	7 7
第7項	モデル酒母中でのテイコ酸溶出	7 8
第8項	清酒小仕込試験	7 9
第4節	考察	8 0
第5節	要約	8 1
第5章	乳酸菌に由来するテイコ酸の $\alpha$ 化米溶解促進	8 2
第1節	緒言	8 2
第2節	実験方法	8 2
第3節	実験結果	8 4
第1項	$\alpha$ 化米溶解試験における基質残存率の経時変化	8 4
第2項	米溶解試験における液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性	8 5
第3項	起源の異なる $\alpha$ -アミラーゼによる溶解	8 5
第4項	$\alpha$ -アミラーゼの吸着に及ぼすテイコ酸量の影響	8 6
第5項	オリゼニンへのテイコ酸の吸着	8 6
第6項	pHの影響	8 8
第7項	酸濃度の影響	8 9
第8項	塩濃度の影響	9 0
第9項	不溶性タンパク質への吸着	9 0
第10項	イオン交換樹脂への吸着	9 1
第4節	考察	9 1
第5節	要約	9 3

総括	9 4
使用記号説明	9 9
引用文献	1 0 1
本論文に関係ある報告	1 0 5
謝辞	1 0 6

## 緒論

清酒醸造では、ビール醸造におけるピッチングイーストに相当するものとして、あらかじめ酒母（酏）が製造される。酒母造り（酏造り）は、乳酸存在下に、細菌の増殖を押さえながら、醪を発酵させるための酵母だけを、純粋に培養する工程である。これには、乳酸菌による自然発酵によって乳酸を蓄積させてから、酵母を添加し比較的長期間（20～22日間）に育成する生酏（きもと）系と、人工的に必要な乳酸を加え、同時に酵母を添加して短期間に酒母を育成する速酏系がある。生酏の製造には、多くの時間と熟練した技術が必要とされるために、現在ではあまり用いられなくなった。

しかしながら、生酏は、速酏と異なった特性を持つことが知られている。その一つに、生酏によって増殖した酵母は、酒母を10℃前後の低温に長期保存（枯らし）した際にも高い生存率を維持することがあげられる。また、生酏では枯らしに移る前に、数時間をかけて品温を30℃付近まで昇温し、約1時間保持する。この操作は温み取りと呼ばれており、その目的についてもいくつかあげられているものの、速酏では酵母が死滅しやすいために、一般に温み取りは行われない。また、生酏を用いた清酒醪は、穏やかな発酵経過を示すが、醪末期も発酵力が衰えないと言われている。しかしながら、経験的に知られたこれらの事象の要因について、詳細な検討は見あたらない。

生酏においては複雑な微生物の遷移、すなわち、硝酸還元菌群、*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sake*, *Sacchromyces cerevisiae*の順に微生物の消長があり、これは特異的な温度経過に依存している。このように清酒酵母 *S. cerevisiae*の増殖にさきだって出現、消滅する微生物は、清酒酵母の生理的な性質または清酒醪の発酵経過に何らかの影響を及ぼすであろうと考えられる。

本研究では、生酏酵母と生酏仕込みの特性の要因を、清酒酵母にさきだって増

殖する微生物に求めて検討し、乳酸菌の増殖が大きな要因になっていることを明らかにした。

以下に本論文の概要を示す。

まず第1章では、酒母中の遊離脂肪酸組成が生醗と速醗では異なり、それを反映して速醗酵母はリノール酸に富んでいるのに対し、生醗酵母はパルミチン酸に富んでいることを示した。さらに、この相違が乳酸菌の増殖に伴うリノール酸の選択的取り込みによることを示した。また、それぞれの酒母を用いて仕込んだ醗において、酵母のリン脂質に同じような脂肪酸組成の違いが認められた。この脂肪酸組成の違いは、酒母酵母の細胞内トリグリセリドが利用されるため、および清酒醗における仕込方法、段仕込法に起因することを示した。すなわち、段仕込法にみられるように、酵母がエタノール存在下に増殖するとき、リン脂質脂肪酸中のパルミチン酸含量はさらに増大することを明らかにした。

第2章では、生醗の酵母はいわゆる「温み取り」（加温処理）に対して耐性を示すことが経験的に知られているが、この現象は、脂肪酸組成の違いから説明できることを示した。

第3章では、膜リン脂質の脂肪酸飽和度の高い細胞は、エタノール存在下で膜バリアー能が高いことを示すとともに、脂質膜の脂肪酸不飽和度の違いが膜バリアー能に及ぼす影響を、リン脂質リボソームを用いて明らかにした。また、この細胞はエタノール中で増殖するとき、さらに脂肪酸組成以外の要因によるバリアー能、およびエタノール耐性の増大が認められることを示した。

第4章では、生醗中の乳酸菌が、麹による蒸米の溶解を促進することを示し、その作用因子の分画、同定を行い、それがテイコ酸であることを示した。さらに、清酒醸造における効果の発現の可能性について検討した。

第5章では、テイコ酸が蒸米の溶解を促進する作用機作について検討し、この現象は、 $\alpha$ -アミラーゼの米タンパク質オリゼニンへの吸着を、テイコ酸が阻害す

ることに起因することを示した。

第1節 緒言

生醗は、乳酸菌などの微生物遷移を伴う伝統的な酒母の製法である。生醗で育成された酵母は温み取りと呼ばれる加温操作に強く、枯らしと呼ばれる長期保存での生存率が高いことが知られている(1)。また、生醗を用いた仕込は、醗初期の醗酵は穏やかであるが、後半もよく発酵するといわれている(1)。こうした事実の要因については、佐藤らの報告(2)の他にはほとんど検討されていない。他方、培地中の脂肪酸組成が醗酵能や、高温での生育に影響を及ぼすことが知られており、培地中の脂肪酸が膜脂質の脂肪酸組成に影響を及ぼした結果と考えられている(3, 4)。

清酒醸造においては、蒸米や麹が脂肪酸の供給源となっており、主要な脂肪酸は飽和脂肪酸であるパルミチン酸(16:0)と、二価不飽和酸であるリノール酸(18:2)である(5, 6)。また、原料米処理や、製麹法によって原料由来の脂肪酸組成を操作することにより、酒質を改変することが試みられている(6, 7)。

この章では、速醗醗と生醗では、育成された酵母のリン脂質脂肪酸組成が異なること、さらに4~5回の細胞分裂を経る醗中でも同様の傾向がみられることを示し、その要因について検討した結果を述べる。

第2節 実験方法

1. 使用菌株

乳酸菌として、自社生醗より分離した *Lactobacillus sake* L5株および *Leuconostoc mesenteroides* L74株を用いた。清酒酵母として、協会7号株(K-7)

を用いた。工業規模の清酒醸造においては、自社研究室で分離したKm601を用いた。

2. 培地

GYP培地(グルコース2%, 酵母エキス0.7%, ポリペプトン0.7%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%)を基礎培地とした。脂肪酸添加効果をみる際には、Chenの方法(8)により脱脂した牛血清アルブミンを含む培地に、0.5mMになるように脂肪酸を加えた。また、脂肪酸をより分散させるために0.1%ポリオキシエチレン(20)セチルエーテルを分散剤として用いることも試みた。乳酸菌の培養においては、GYP培地の他に、1%ポリペプトンを加えたBrix5麹汁(麹汁ペプトン培地)を用い、麹汁は煮沸後ニトロセルロース・メンブランフィルター(ポア・サイズ0.45 $\mu$ )で循環ろ過し、可及的に脂質を除去したものをを用いた。

3. 培養条件

酵母は、植菌量1/100とし、特にことわらない限り20℃に4日間静置培養した。また、1~5世代までの定常期酵母を調製する際には、接種量を約 $10^6 \sim 10^7$ /mlにわたって変え、それぞれ増殖定常期に達するまで培養を行った。平均世代数は寒天平板培養によって初発菌数と培養後の菌数から計算した。乳酸菌は、植菌量1/1000とし、15℃、7日間、または30℃、2日間培養した。

4. 糖化醗における乳酸菌培養

蒸米6g、米麹14g、水道水29mlを57℃に14時間糖化後、乳酸菌L74株、またはL5株の培養液50 $\mu$ lを植菌し、15℃に7日間培養した。

5. 酒母および醗中の酵母の分離

酒母および清酒醗からの酵母の分画に際しては、醗をガーゼでろ過して米粒を除き、ろ過液を1,600 x g、5分間遠心分離してペレット上層の澱粉層を洗い流した。再び蒸留水に懸濁し、位相差顕微鏡下で澱粉ゲルが見えなくなるまでこの操作を繰り返した。

## 6. 脂質の抽出と分画

酵母および乳酸菌菌体を2,000 x g, 5分間遠心分離して集菌し, 0.85% NaClで2回洗浄, さらに菌体に付着している脂肪酸を除くために石油エーテル-エーテル(2:1)で洗浄後, 凍結乾燥した. 凍結乾燥菌体から, クロロホルム・メタノール(1:1)を用いてBligh, Dyerの方法(9)に従って全脂質を抽出した. 抽出溶媒は35°C以下で減圧下に留去し, クロロホルム・メタノール(1:1)に再溶解後, シリカゲル60A(500 μm厚, ワットマン)を用いた薄層クロマトグラフィーを行った. リン脂質の展開には, 展開溶媒としてクロロホルム・メタノール・酢酸・水(85:15:10:4)を用い, 遊離脂肪酸の分画のために石油エーテル・エーテル・酢酸(85:15:1)を用いた. 各画分の検出はヨード蒸気により, またリン脂質にはDittmer-Zinzade試薬(10)を併用し, 標準物質のRf値との比較により同定した. 各画分はシリカゲルをかきとり, クロロホルム・メタノール(1:1)で溶出後, 窒素ガス気流中で溶媒を留去し, 脂肪酸組成分析に供した.

糖化醪および酒母からの脂質の抽出に際しては, 醪全量, または酒母30gを凍結乾燥後, 菌体からの抽出に準じて行った. すなわち, クロロホルム・メタノール(1:1)60mlを用いて2回, または石油エーテル・エーテル(2:1)を用いて2回振とう抽出を行った後, 溶媒を0.9% NaClで洗浄した.

## 7. 脂肪酸の分析

植田の方法(11)に準じて3% HCl-メタノールにより, 分画脂質または凍結乾燥菌体から脂肪酸メチルエステルを調製し, 分析試料とした. GLC分析は, IshikawaとYoshizawaの方法(12)に従い, 10% EGSS-X(2m x 3mm, 175°C)カラムを用いて行った.

## 8. 脂質分析

イアトロスキャンTLC-FIDアナライザー MK-5(Iatron Laboratories)を用いて, 脂質の定量分析を行った(13). 全脂質をシリカゲルをコーティングしたガラスロ

ッド, クロマトロッド S-IIにスポットし, 石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸(85:15:1)を用いて展開し, 中性脂質を分離した. 原点に残ったリン脂質は, さらにクロロホルム-メタノール-水(45:20:2)を用いて2回展開することにより, 定量した. 定量のための標準物質として, tri-palmitin, palmitic acid, cholesterol palmitate, cholesterol, L-α-dipalmitoyl-phosphatidyl choline, L-α-dipalmitoyl-phosphatidyl ethanolamineを用いた.

## 第3節 実験結果

### 1. 酒母における酵母のリン脂質脂肪酸組成

自社酒造場において速醸醪および生醪で育成された酵母を分画し, そのリン脂質組成を調べた結果をTable 1-1に示す.

Table 1-1. Fatty acid composition of lipids extracted from yeast grown in *sokujo-moto* and *kimoto*.

Moto	Lipid	Fatty acid composition(%)					
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
<i>Sokujo-moto</i>	PE	ND <sup>a</sup>	29.1	5.9	14.9	19.5	30.6
	PC	ND	23.4	tr.	17.6	20.1	48.4
	PI	ND	32.9	4.0	18.2	17.0	27.9
	TG	3.6	35.0	1.0	6.5	14.7	39.2
<i>Kimoto</i>	PE	7.3	35.2	23.8	15.1	15.1	tr. <sup>b</sup>
	PC	ND	29.5	12.3	32.7	19.9	5.5
	PI	ND	47.5	13.2	18.7	11.6	5.7
	TG	ND	55.5	2.2	11.8	21.0	5.8

Fatty acids are denoted by the number of carbon atoms:number of unsaturated linkages. Abbreviations: PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; TG, triglyceride.

<sup>a</sup> Not detected.

<sup>b</sup> Trace.

速醸醪で育成された酵母のリン脂質は, ホスファチジルコリン(PC), ホスファチジルエタノールアミン(PE), ホスファチジルイノシトール(PI)のいずれにおい

ても、リノール酸の比率がおおよそ30~50%と、生醗で育成した酵母に比べて高い値を示した。他方、生醗で育成された酵母の場合は、数%のリノール酸含量を示し、パルミチン酸、またはステアリン酸が増大している傾向が認められた。また、単純脂質であるトリグリセリド(TG)においても、その傾向は同様であった。

酵母中の酵母脂質の脂肪酸組成に及ぼす培地中の脂肪酸の影響を検討した。すなわち、0.1%Brij58を分散剤として0.5mM脂肪酸を加えたGYP培地で酵母を20℃、4日間培養し、定常期菌体中のリン脂質脂肪酸組成を測定したところ、Table 1-2に示す結果が得られた。リン脂質の種類による違いは認められるものの、PC、PE、PIのいずれにおいても、脂質中に占める添加脂肪酸の比率が著しく増大していた。また、単純脂質であるTGにおいても、同様の傾向が認められた。これらのことから、IshikawaとYoshizawaが既に報告しているように(12)、菌体脂質の脂肪酸組成は培地中に存在する脂肪酸に大きな影響を受けるものと考えられた。

Table 1-2. Fatty acid composition of phospholipids extracted from yeast grown on different fatty acid supplements.

Fatty acid added	PL	Fatty acid composition(%)							
		12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
None	PE	3.4	10.6	2.5	28.8	38.9	4.5	11.4	ND
	PC	4.0	8.6	0.5	35.0	27.3	11.6	13.0	ND
	PI	7.3	7.2	1.8	45.1	16.6	19.5	7.0	ND
16:0	PE	0.9	1.3	0.2	46.0	43.5	2.3	5.7	ND
	PC	1.3	1.6	0.3	53.7	32.8	4.7	5.5	ND
	PI	3.5	0.9	0.3	60.8	22.0	8.5	3.9	ND
	TG	5.1	2.2	ND	64.0	16.5	7.7	4.5	ND
18:1	PE	1.2	3.8	ND	9.6	3.9	3.0	76.8	ND
	PC	1.5	2.8	tr.	6.6	1.9	2.7	84.4	ND
	PI	3.2	4.3	tr.	21.7	2.4	7.1	61.3	ND
	TG	5.2	3.9	ND	8.7	2.1	6.3	73.8	ND
18:2	PE	1.4	5.3	ND	21.1	2.5	3.1	1.1	65.4
	PC	7.8	9.4	0.1	19.1	1.6	9.2	1.9	72.0
	PI	7.6	6.0	tr.	30.5	1.3	10.3	1.2	43.0
	TG	4.9	5.4	tr.	11.4	3.9	8.2	3.0	63.2

Cultures were incubated in GYP medium supplemented with 0.1% polyoxyethylene(20) cetyl ether, and 0.5 mM fatty acid until they reached the early stationary phase. Abbreviations: PL, phospholipids. Refer to Table 1-1 for other abbreviations.

そこで、生醗および速醗において、酵母中の遊離脂肪酸組成を比較するために、それぞれ酒母ろ液の比重(Baume)が最高値を示したときの試料を用いて脂肪酸分析を行った。その結果をTable 1-3に示す。速醗は、抽出溶媒に石油エーテル・エーテルを用いた場合と、クロロホルム・メタノールを用いた場合のいずれにおいても遊離脂肪酸組成は異ならず、リノール酸が主要脂肪酸であった。他方、生醗では、石油エーテル・エーテルを抽出溶媒に用いると、遊離脂肪酸中のリノール酸の比率は著しく低下し、パルミチン酸が大きな比率を占めた。クロロホルム・メタノールによる抽出では米粒組織内部の脂肪酸も抽出される。これに対して、石油エーテル・エーテルでは、細胞内脂質を抽出できないことを確かめており、石油エーテル・エーテルを用いた抽出では、酒母液相や固相の表面に存在する遊離脂肪酸のみが溶解されていると考えられた。このことから、酵母中で酵母が取り込み、利用することのできる遊離脂肪酸組成は、生醗と速醗では大きく異なり、酵母の脂質脂肪酸組成はこれを反映したものであると考えられた。

Table 1-3. Composition of free fatty acids extracted from *moto*.

Solvent for extraction	Moto	Fatty acid composition							Total
		14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3		
Petroleum ether:Ether (2:1)	Kimoto	(mg)	0.11	2.06	0.06	0.05	0.09	ND	2.47
		(%)	4.3	87.4	2.6	2.1	3.5	-	
	Sokujo-moto	(mg)	0.06	0.33	0.03	0.14	0.54	0.02	1.12
		(%)	5.4	30.1	2.5	12.9	47.8	1.4	
Chloroform:Methanol (1:1)	Kimoto	(mg)	0.23	3.45	0.27	1.16	2.25	0.07	7.43
		(%)	3.1	46.6	3.6	16.1	29.8	0.8	
	Sokujo-moto	(mg)	0.17	3.12	0.17	0.81	3.1	0.10	6.47
		(%)	2.6	33.1	2.6	13.0	47.3	1.5	

Thirty grams of *moto* were lyophilized, and lipids were extracted with 60 ml of solvent for 2 min twice. Fatty acid fractions on a silica gel plate by TLC were extracted with chloroform:methanol(1:1).

## 2. 酵母のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす乳酸菌の影響

生醗と速醗の遊離脂肪酸組成の違いの要因を検討するために、乳酸菌増殖の影響を見た。すなわち、蒸米、米麴から調製した糖化醗を用いて乳酸菌L5株、またはL74株を15°Cにおいて7日間培養し、培養前後の糖化醗中の遊離脂肪酸組成を測定した結果をTable 1-4に示す。クロロホルム・メタノールで抽出される遊離脂肪酸の組成は、培養前後ではほぼ同じ値を示し、リノール酸は約32~38%を占めた。他方、石油エーテル・エーテルで抽出した際には、乳酸菌を培養した糖化醗中では、リノール酸の占める比率が2~3%に低下し、パルミチン酸が大部分を占めた。このことから、乳酸菌の増殖が、生醗と速醗の遊離脂肪酸組成の違いの要因になっていると考えられた。

Table 1-4. Composition of free fatty acids in *moromi* mash.

Solvent for extraction	Inoculum	Fatty acid composition								
		12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	Total		
Petroleum ether:Ether (2:1)	no	(mg)	ND	0.039	0.594	0.049	0.206	0.345	1.233	
		(%)	—	3.2	48.2	4.0	16.6	28.0		
	L74	(mg)	ND	0.067	2.145	0.485	0.074	0.065	2.848	
		(%)	—	2.4	75.3	17.0	2.6	2.3		
	L5	(mg)	ND	0.082	2.511	0.418	0.086	0.069	3.171	
		(%)	—	2.6	79.2	13.2	2.7	2.2		
Chloroform:Methanol (1:1)	no	(mg)	0.127	0.064	5.681	0.477	1.515	5.272	13.767	
		(%)	1.6	4.4	41.3	3.5	11.0	38.3		
	L74	(mg)	0.195	0.659	7.285	0.721	1.870	5.034	15.768	
		(%)	1.2	4.2	46.2	4.6	11.9	32.0		
	L5	(mg)	0.205	0.704	8.348	0.817	2.155	5.948	17.177	
		(%)	1.1	3.9	45.9	4.5	12.0	32.7		

Each *moromi* mash was prepared by saccharizing a mixture composed of steamed rice (14g), rice *koji* (6g), and tap water (29ml) at 57°C for 14 h, and inoculated with one loopful of *Lactobacillus sake* L5, or *Leuconostoc mesenteroides* L74. Cultures were incubated at 15°C for 1 week.

リノール酸が乳酸菌に取り込まれ、利用されることを確認するために、0.5mM リノール酸を含む麹汁ペプトン培地で生育した乳酸菌L5株の菌体脂肪酸組成を測定した。結果をTable 1-5に示す。脂肪酸を含まない培地で生育した乳酸菌においては、菌体脂肪酸中に占める主要な不飽和脂肪酸はC<sub>18:1</sub>酸であった。なお、Uchidaと Mogiは *Lactobacillus* 属の菌体脂肪酸に見いだされるC<sub>18:1</sub>酸の大部分が、cis-バクセン酸であることを報告している(14)。他方、リノール酸を添加した培地で生育した乳酸菌菌体においては、リノール酸が主要な不飽和脂肪酸になっていた。また、培養温度15°Cでは、30°Cに比べて、リノール酸の菌体脂肪酸中に占める比率がさらに増大し、約70%となった。この時の乾燥菌体中の脂肪酸総量は、リノール酸を含まない培地で生育した菌体では2.1mg/100mgであるのに対し、リノール酸を添加した培地で増殖した菌体では2.3mg/100mgとなり、ほぼ同様の値を示した。これらの結果から、乳酸菌はリノール酸を取り込み、菌体脂肪酸として利用しているものと考えられた。

Table 1-5. Effect of linoleic acid on cellular fatty acid composition of *Lactobacillus sake* L5.

Temp. (°C)	Addition of 18:2	Fatty acid composition (%)							
		14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	19-cy <sup>a</sup>
30	-	0.6	ND <sup>b</sup>	45.0	3.4	6.2	34.3	ND	10.5
	+	1.4	0.4	24.2	3.1	1.0	22.4	41.6	5.8
15	-	0.7	ND	31.6	6.6	2.8	54.7	ND	3.5
		(16.8) <sup>c</sup>		(720.6)	(15.1)	(66.2)	(1214.6)		
	+	1.5	0.5	12.0	3.2	1.2	12.4	69.2	ND
		(35.9)	(12.1)	(276.3)	(73.3)	(27.6)	(277.9)	(1636.1)	

Strain L5 was inoculated 1:1000 from fresh cultures of growth medium into 500 ml of *koji* extract (Brix 5) supplemented with 0.5 mM linoleic acid and/or 1% peptone plus 1% defatted albumin. When the stationary phase of growth was attained, cultures were harvested by centrifugation at 180,000xg for 20 min, followed by washing twice in 500 ml of 0.85% NaCl aq. and once in petroleum ether-diethylether (1:1).

<sup>a</sup> cy denotes cyclopropane acid.

<sup>b</sup> Not detected.

<sup>c</sup> The values in parentheses indicate the content of each fatty acid ( $\mu$ g/100mg dry weight).

### 3. 乳酸菌の増殖に及ぼすリノール酸の影響

不飽和脂肪酸には、オレイン酸のように乳酸菌の生育に促進的に働くものと、パルミチン酸のように阻害的に働くものがある事が知られている(15)。0.5mM脂肪酸を含むGYP培地における、15°Cでの乳酸菌の増殖経過をFig. 1-1に示す。生醗から分離された乳酸菌L5株、L74株のいずれにおいても、15°Cでオレイン酸と同様にリノール酸によっても著しい増殖促進効果が認められた。このことから、リノール酸を含む酒母の環境はこれらの乳酸菌にニッチ(生態的地位)を与えていると推察される。

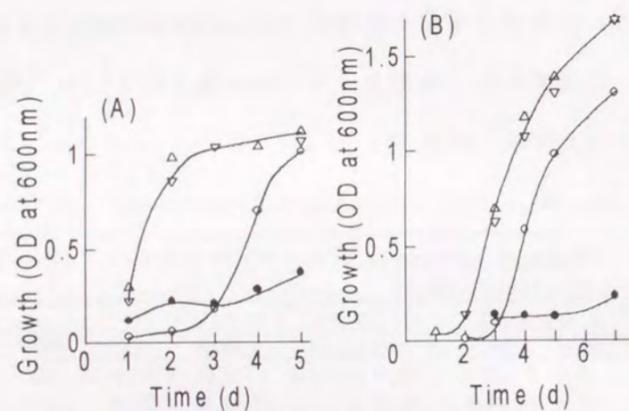


Fig. 1-1. Effects of various fatty acid on the growth of lactic acid bacteria isolated from kimoto. *Leuconostoc mesenteroides* L74 (A), or *Lactobacillus sake* L5 (B) was incubated in a dilution of 1:1000 from fresh cultures of growth medium into 50 ml of GYP medium supplemented with 0.1% polyoxyethylene(20) cetyl ether, and 0.5 mM fatty acid (palmitic acid(●), oleic acid(△), linoleic acid(▽), or no addition(○)), followed by incubation at 15°C for as long as 1 week.

### 4. 清酒醪における酵母のリン脂質組成

生醗, 速醸醗, およびそれぞれの酒母を用いた清酒醪中の酵母のPC, PEの脂肪酸組成をTable 1-6に示す。

Table 1-6. Fatty acid composition of phospholipids extracted from the yeast in sake mash

Seed mash	PL	Time(d) <sup>b</sup>	Fatty acid composition(%) <sup>a</sup>					Δ/mol <sup>c</sup>		
			14:0	16:0	16:1	18:0	18:1		18:2	
Kimoto	PC	0	ND <sup>d</sup>	29.5	12.3	32.7	19.9	5.5	0.43	
		3	5.8	42.2	8.3	23.0	10.2	10.6	0.40	
		6	4.9	43.5	8.6	25.2	10.2	7.7	0.34	
		10	6.0	42.2	12.8	23.8	12.1	3.1	0.31	
	PE	0	7.3	35.2	23.8	15.1	15.1	tr. <sup>e</sup>	0.39	
		3	1.6	32.1	1.6	55.6	7.3	1.9	0.13	
		6	3.2	46.5	3.2	36.9	5.5	4.7	0.18	
		10	4.6	39.3	10.5	27.5	13.9	4.2	0.33	
		Sokujo-moto	0	ND	23.6	tr.	17.6	20.1	48.4	1.17
			3	3.2	46.9	2.1	12.2	7.3	28.3	0.66
6	4.8		38.0	4.1	16.5	10.9	25.8	0.67		
10	tr.		37.5	3.5	20.4	9.2	29.5	0.72		
PE	0	ND	29.1	5.9	14.9	19.5	30.6	0.87		
	3	4.8	42.2	5.2	32.8	8.4	6.8	0.27		
	6	1.7	36.5	5.8	45.6	5.2	6.1	0.23		
	10	4.1	50.9	7.2	19.8	8.8	9.2	0.34		

<sup>a</sup> Fatty acids are denoted by the number of carbon atoms:number of unsaturated linkages

<sup>b</sup> Time means fermentation days after last feed in the main mash, and the lipid values of the seed mash are from an 0 d reading.

<sup>c</sup> The values of unsaturation(Δ/mol) were calculated as (% monoene+2[% diene])/100.

<sup>d</sup> Not detected.

PE中の脂肪酸組成に占めるリノール酸は、速醸醗で30.6%であったのに対してその清酒醪では6~9%に減少したが、PC中では酒母で48.4%であったものが醗期間を通じて20~30%に減少したにとどまった。清酒醪中で酵母は4~5回の細胞分裂を行うと考えられるにも関わらず、PC中のリノール酸はそれほど減少していない。清酒酵母は通常リノール酸をほとんど合成しないので、酒母酵母の貯留脂質

がリノール酸の主要な供給源になっていると考えられる。他方、生醗を用いた清酒醗では、生醗同様に酵母リン脂質中のリノール酸含量は低かった。リン脂質中にリノール酸の増加がみられないことは、酵母の増殖初期にはまだリノール酸を供給するほどに米、米麴の消化が十分に進んでいないことを示している。また、いずれの酒母を用いた醗中の酵母においても、パルミチン酸またはステアリン酸の含量が増大している傾向が認められた。清酒醗中では、三段仕込と呼ばれる仕込方法がとられ、酵母は4%程度のエタノールの存在下で増殖するので、それが脂質脂肪酸組成に及ぼす可能性も考慮する必要があると考えられる。

不飽和脂肪酸は、対応する飽和脂肪酸より低い融点をもっている。脂肪酸不飽和度( $\Delta/\text{mol}$ )は、全脂肪酸のモルあたり二重結合( $\Delta$ )の平均数によって表され、膜流動性との関連性が知られている(16)。清酒醗中における酵母のPCの脂肪酸不飽和度は、Table 1-6に示すように生醗酵母で0.31~0.40、速醗酵母で0.66~0.72となり、PEの不飽和度は生醗酵母で0.13~0.33、速醗酵母で0.27~0.34となった。このように、生醗と速醗ではリノール酸含量の違いによって脂肪酸不飽和度が異なり、膜流動性にも違いが生じると考えられた。

##### 5. PC/PE比に及ぼすリノール酸の影響

PCとPEは清酒酵母のリン脂質の主要成分であるが、PEに比べてPCでは塩基部分が多いなどの性質の違いがあり、PC/PE比は重要な指標であると思われる。PCとPEは、Fig. 1-2に示すようにシリカゲルをコーティングしたガラスロッド上で分離した。清酒醗中の酵母のPC/PE比の経時変化をFig. 1-3に示す。酒母中の酵母のPC/PEは、生醗では0.59、速醗では1.59と異なっていた。それぞれの酒母を用いた清酒醗中の酵母では、増殖期にあたる醗初期にはいずれも1.85~2.0と高い値を示したが、醗後半には酒母にみられたと同様の差異が認められた。

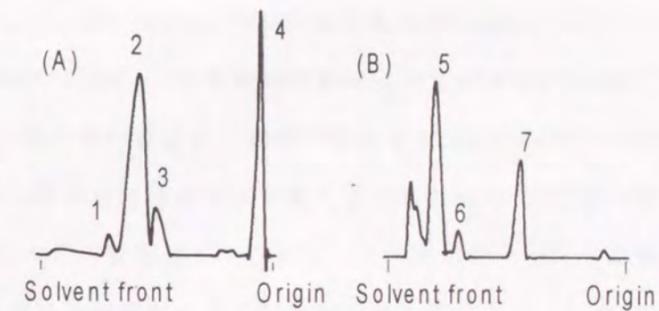


Fig. 1-2. Chromatograms of total lipid(A) and phospholipid(B) obtained from K-7 cells by thin-layer chromatography with flame ionization detection. Phospholipids were separated by duplicate development with chloroform-methanol-H<sub>2</sub>O(45:20:2) after a development with petroleum ether-diethyl ether-acetic acid(85:10:1), and neutral lipids detected. 1, sterol ester; 2, triglyceride; 3, fatty acid; 4, phospholipid; 5, phosphatidylethanolamine; 6, phosphatidylinositol plus phosphatidylserine; 7, phosphatidylcholine.

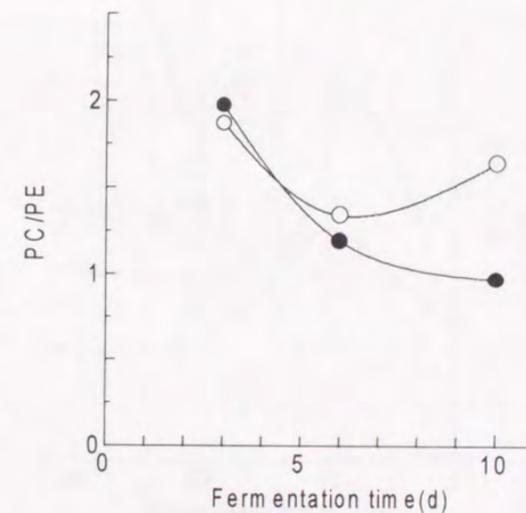


Fig. 1-3. Change of the PC/PE ratio of the yeast cells in sake brewing. Symbols: ○, the main mash seeded with *sokujo-moto*; ●, the main mash seeded with *kimoto*. The ratio value in the seed mash is 0.59 for *kimoto* and 1.59 for *sokujo-moto*.

酒造現場においては生醗と速醗を用いた清酒醗の間には、発酵制御に幾分の違いがあるので、PC/PE比の違いを液体培養を用いて検討した。0.5mMリノール酸またはパルミチン酸を含むGYP培地に1/50量の接種を行い、15°Cで培養してPC/PE比の経時変化を求め、Fig. 1-4に示す結果を得た。どちらの脂肪酸を添加した際にも、対数増殖期の間PC/PE比は増大し、増殖減衰期から定常期にかけて最小値に達し、この値はリノール酸に比べて、パルミチン酸添加の方が小さかった。対数増殖期にPC/PE比が大きくなるのは、増殖に必要な膜機能を果たすためには高いPC/PE比が要求されることを示唆していると考えられ、同じ脂肪酸組成でもPEに比べてPCの相転移点が30°C低く、そのため高い膜流動性が得られることとの関連が予想される。

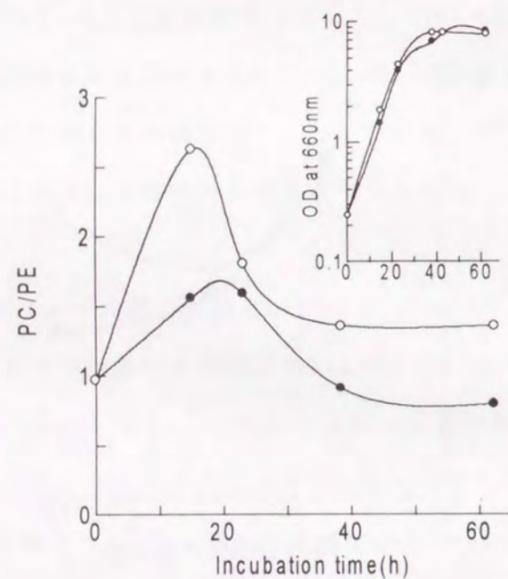


Fig. 1-4. Time course of growth and the PC/PE ratio of the yeast cells in liquid culture. Cultures were incubated in the medium supplemented with 0.5 mM linoleic acid(○) or palmitic acid(●). Growth was followed by measuring the optical density(OD) at 660nm.

定常期酵母のPC/PE比に及ぼす脂肪酸の影響を検討するため、4回の繰り返し実験によりリノール酸、またはパルミチン酸の添加効果を見たところ、Fig. 1-5に示す結果を得た。両者のPC/PE比の間には、平均値の差の検定によって有意な差が認められたことから、リノール酸がパルミチン酸に比べてPC合成を促進するものと考えられた。

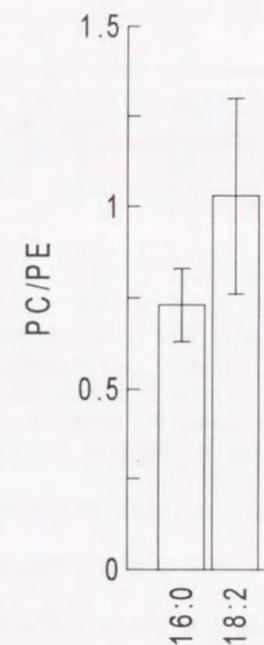


Fig. 1-5. Effect of fatty acid on the PC/PE ratio. Samples were grown at 20°C for 4 days in medium supplemented with 0.5 mM palmitic acid(16:0) or linoleic acid(18:2). The experiments were done with four replicates, and vertical bars indicate 95% confidence limits.

## 6. 清酒醪の酵母の脂質組成と菌体内トリグリセリドの分解利用

醪中の酵母のリン脂質脂肪酸組成が、酒母のそれと殆ど変わらない要因として、細胞内貯留脂質の利用が考えられる。そこで、速醸醪、生醪およびそれぞれの清酒醪から分画した酵母の脂質組成をTLC-FID法により分析した。Table 1-7に示すように、酒母中の酵母には著量のTGが検出されたが、清酒醪における増殖期(留仕込後3~6日目)には著しく減少しており、発酵期(留11日目)にわずかに増加する傾向がみられた。リン脂質量には清酒醸造期間を通じて、顕著な変化がみられなかった。

Table. 1-7 Change in lipid contents of the yeast in sake brewing

Mash	Lipid(mg/g-dry cell)			
	TG	FFA	SE+WE	PL
<i>sokujo-moto</i>	22.9	7.3	3.3	9.7
3d after <i>tomezoe</i>	3.5	2.0	1.7	7.8
6d after <i>tomezoe</i>	6.6	2.3	2.0	10.0
10d after <i>tomezoe</i>	11.2	3.0	2.2	12.6
<i>Kimoto</i>	25.6	9.2	3.2	12.3
3d after <i>tomezoe</i>	6.1	1.7	1.5	11.4
6d after <i>tomezoe</i>	6.6	4.5	3.2	9.8
10d after <i>tomezoe</i>	11.5	8.0	2.0	10.8

Abbreviations: TG, triglyceride; FFA, free fatty acid; SE, sterol ester; WE, wax ester; PL, phospholipid.

上述のように脂質分析の結果、酒母の酵母は著量のTGを貯留していたので、TGの貯留に及ぼす培地の遊離脂肪酸の影響を見るため、次の検討を行った。すなわち、協会7号の前培養液をGYP培地に1/50量接種後、15℃にて培養し、培地中のリノール酸の有無が細胞内TG量に及ぼす効果を観察した。結果はFig. 1-6に示すように、リノール酸が存在すると増殖とともに急激にTG量が増大するのに対し、脂肪酸を含まない培地では、対数増殖期にTG量のわずかな減少があったが、大きな変動は認められなかった。これらのことから、清酒醪において酵母の増殖期にTG

量が低く保たれているのは、酵母の増殖初期には遊離脂肪酸が十分量ないことを示唆している。清酒醪の初期の液層中にほとんど粗脂肪がないことは、石川、吉沢によっても報告されている(17)。

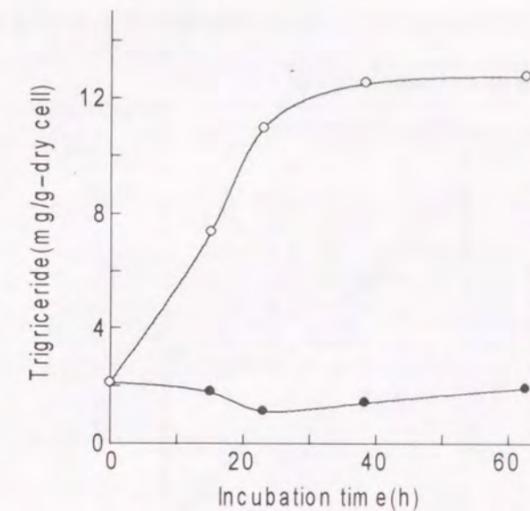


Fig. 1-6. Effect of supplementary fatty acid on accumulation of triglyceride. *S. cerevisiae* K-7 was incubated at 15°C in the medium supplemented with 0.5 mM linoleic acid (○) or without fatty acid (●).

酒母において酵母細胞内に著量蓄えられていたTGが、清酒醪前半には小さな含量を示すのは、単に細胞分裂の結果であるのか、あるいは脂質合成にTGの利用されることの影響があるのかということについて、以下に検討した。

*S. cerevisiae*はリノール酸をほとんど生合成しないので、リノール酸に富む細胞を接種することにより、TG量の減少の要因を推定した。接種細胞は、0.5mMリノール酸を含むGYP培地で培養し、リノール酸を含まない培地に菌密度 $10^6 \sim 10^7$ /mlの範囲にわたるような種々の量の接種を行って、定常期まで培養した。接種細胞の初発TG、およびTG中のリノール酸含量に対する培養後の含量比をそれぞれ求め、培養菌体の平均世代数との関係を示した結果がFig. 1-7である。細胞内

TG量が世代数の増加ごとに1/2以上に減少しており、ほぼ一定の値を示すまでに3~4回の細胞分裂が行われていることから、増殖初期にはTG分解活性は合成活性より大きいものと考えられる。TG中のリノール酸量は、各世代ごとにTGに比べてより大きな割合で減少した。このことは、脂肪酸を含まない培地中では貯留されていたTGの分解があることを示している。

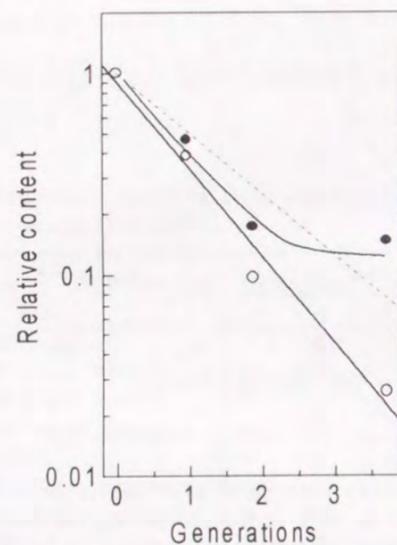


Fig. 1-7. Decrease of triglyceride and a constituent linoleic acid of TG with generations of growth. The inoculum was prepared from a culture incubated in the medium supplemented with linoleic acid as described in Fig. 6, and various high-level yeast inocula were employed. The cultures were incubated in a fatty acid-free medium until they reached the stationary phase of growth. The content of triglyceride(●), and linoleic acid(○) as a constituent of triglyceride were expressed in the ratio with respect to the initial content.

Fig. 1-7に示した条件と同様に培養した菌体を、リン脂質の脂肪酸組成の測定に用いた。Table 1-8にPC, PE, TGの脂肪酸組成と菌体の平均世代との関係を示す。PC, PE中のリノール酸含量は細胞数が倍になるに従って1/2に減少せず、比較的高いレベルを維持した。他方、TG中には著量のリノール酸が認められたが、パルミトレイン酸の増加とともに漸減した。これらのことから、速醸醗のようにリノ

ール酸を含む前培養によって、リン脂質中のリノール酸含量が高く維持されたと考えられる。

Table 1-8. Fatty acid composition of intracellular lipids of inoculum grown in linoleic acid

Lipid	Generations	Fatty acid composition(%)						
		14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
PC	0.95	5.2	4.3	36.9	11.7	24.1	9.9	7.9
	3.71	4.6	6.7	28.3	6.8	32.7	12.2	8.7
PE	0	5.2	3.2	29.1	10.7	20.8	10.8	20.2
	0.95	5.4	5.5	25.2	7.9	32.1	12.4	11.6
	1.87	5.1	3.7	32.0	12.2	22.8	14.9	9.3
	3.71	7.0	4.9	32.2	12.7	27.0	9.8	6.5
TG	0	4.4	0.3	6.7	6.1	5.5	4.4	72.6
	0.95	5.4	0.7	9.8	11.0	6.9	5.8	60.5
	1.87	5.2	0.8	12.9	21.0	7.7	11.0	41.3
	3.71	6.1	2.2	15.5	37.7	8.8	17.0	12.7

7. エタノール存在下に増殖することの影響

清酒醪においては、4%程度のエタノールの存在下で酵母の増殖が行われると考えられ、脂肪酸組成もそれに適応して変化していると考えられる。そこで、協会7号酵母を、パルミチン酸またはリノール酸とともに、種々の濃度のエタノールを含むGYP培地に培養後、その菌体のリン脂質組成、及びリン脂質脂肪酸組成を測定した。また、エタノールを含まない培地で培養した菌体を、増殖をほぼ完全に阻害する12%エタノール添加培地に置換培養した際の、脂肪酸組成の変化をみた。結果をTable 1-9に示す。

Table 1-9. Fatty acid composition of phospholipid in yeast grown in the presence of ethanol

Added FFA	PL	EtOH(%)	Fatty acid composition(%)							$\Delta$ /mol*
			14:1	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	
16:0	PC	0	6.6	11.8	34.2	18.4	11.8	17.1	0	0.47
		4	5.7	0.8	86.1	3.9	2.7	4.2	1.5	0.11
		8	1.4	ND	83.4	3.4	3.0	7.1	1.8	0.14
16:0	PE	0/12 <sup>b</sup>	4.3	9.3	37.9	20.7	11.4	16.4	0	0.46
		0	4.4	3.3	42.9	23.6	8.8	17.0	0	0.44
		4	1.5	ND	49.9	14.5	7.2	18.5	3.2	0.40
16:0	PE	8	4.4	0.2	50.4	10.2	4.8	19.4	10.7	0.51
		0/12 <sup>b</sup>	3.9	5.7	37.3	23.7	10.1	19.3	0	0.49
		0	4.4	6.9	39.4	15.7	8.8	10.2	14.6	0.61
18:2	PC	4	5.3	1.1	29.3	6.9	12.8	29.8	14.9	0.48
		8	5.1	1.7	27.5	10.1	6.7	33.1	15.7	0.76
		0/12 <sup>b</sup>	6.4	5.0	37.1	9.3	11.4	12.9	17.9	0.63
18:2	PE	0	4.7	7.7	31.5	17.1	8.7	14.4	15.8	0.71
		4	4.6	0.3	24.5	7.3	5.4	24.5	33.3	0.99
		8	4.3	0.5	24.7	7.8	6.3	21.1	35.3	1.00
		0/12 <sup>b</sup>	7.7	2.8	33.1	9.2	9.2	7.7	30.3	0.80

Fatty acids are denoted by the number of carbon atoms:number of unsaturated linkages.

\* The values of unsaturation( $\Delta$ /mol) were calculated as (% monoene +2[% diene])/100.

<sup>b</sup> An stationary-phase cells grown for 4 d at 20°C in the absence of ethanol were transferred to the replacement culture at 15°C for 3 days at a density as high as 2x10<sup>8</sup>/ml.

エタノール存在下で増殖するとき、培地中にパルミチン酸が添加されていると、

リン脂質中のパルミチン酸が著しく増大するとともに、ミリストオレイン酸(14:1)、パルミトオレイン酸(16:1)及びオレイン酸が減少した。8%エタノールの存在下では、PE中に無視できない量のリノール酸が認められたが、 $\Delta$ -9 desaturaseが酵母で唯一知られている脂肪酸不飽和化酵素であることから、異常な不飽和化が起こっていることを示唆していると考えられる。しかしながら、全体の不飽和度はエタノールのない場合のそれに比べて減少していた。他方、エタノール存在下にリノール酸が添加された場合には、オレイン酸の増大とこれに対応したパルミチン酸、ミリストオレイン酸(14:1)、パルミトオレイン酸(16:1)の減少が認められ、リン脂質の不飽和度は増大した。Beavanらは、*S. cerevisiae* NCYC431が脂肪酸を含まない培地でエタノール存在下に増殖するとき、パルミチン酸が減少しオレイン酸が増えて、リン脂質の脂肪酸不飽和度が増大することを報告している(18)。

このように、パルミチン酸とリノール酸添加の間には、エタノールによるリン脂質脂肪酸の組成の変化に違いが認められた。しかしながら、増殖培地に4%、および8%エタノールを添加した場合の乾燥菌体増殖量は、パルミチン酸があるとき、エタノールを添加しない場合に比較してそれぞれ90.6%、66.6%に低下したのに対し、リノール酸があるときには66.3%、39.1%に、脂肪酸無添加のときには74.9%、39.4%となった。このことから、パルミチン酸の存在することが、エタノール存在下での増殖に有効であることを示していると考えられた。

脂肪酸合成を阻害するためにセルレニン2.5  $\mu$ g/mlを含む培地で、パルミチン酸を添加して酵母を培養したところ、Table 1-10に示すように、対照に比べてむしろパルミトオレイン酸が増大した。また、リノール酸添加では殆ど増殖が認められなかった。このことは、酵母は細胞外から取り込まれたパルミチン酸に対して、十分に不飽和化能を有していることを示しており、添加パルミチン酸が不飽和化されずにリン脂質アシル基に利用されることは、エタノール存在下で増殖

Table 1-10. Effect of cerulenin on phosphatidylcholine fatty acyl composition of cells grown on palmitic acid.

Addition of		Fatty acid composition(%)							$\Delta$ /mol
Palmitic acid	Cerulenin	14:1	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	
-	-	9.0	0.5	36.5	28.4	12.1	13.5	ND	0.42
+	-	8.3	1.8	38.5	18.9	17.7	14.8	ND	0.36
+	+	ND	ND	40.2	36.0	11.4	12.4	ND	0.48

するための適応現象と考えられた。Ingramらは、エタノール存在下に増殖する *E. coli* において観察される飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸へのシフトはパルミチン酸を添加することにより消失することを報告している(19, 20)。さらに、エタノールによる不飽和酸, *cis*-バクセン酸の増大が不飽和脂肪酸合成量の増大によるのではなく、飽和脂肪酸合成量が減少することに起因することを示している(19, 20)。このことから、Beavanらの報告による、エタノール存在下に増殖する酵母に観察されるオレイン酸の増大は(18)、エタノールによって飽和脂肪酸合成量が低下した結果である可能性が考えられる。飽和脂肪酸の減少に伴い、より鎖長の長い不飽和酸が増加することから、不飽和度の増大というよりむしろ脂肪酸の平均鎖長を長くすることによって、エタノール環境に適応していると推察される。少なくとも *E. coli* にあっては、自然にみられる *cis* 型のバクセン酸やオレイン酸に比べて、*trans* 型の方がエタノール耐性を増すことから、*cis*-不飽和化より鎖長延長に意義があると考えられている(21)。

他方、エタノールを含まない培地で培養した菌体を、増殖を阻害する12%エタノール含有培地に移したとき、リン脂質脂肪酸組成に殆ど変化はみられなかった。このことから、エタノールに対する適応現象は、リン脂質脂肪酸組成に関しては主として増殖期に起こるものと考えられた。

PC/PE比の変化をTable 1-11に示す。エタノール存在下に増殖することによりPCとPEの量は減少する傾向にあり、前述のように、リノール酸の添加はPC/PE比を増大させた。特に、8%エタノールの存在下では、PC/PE比は8.95と異常に大き

な値を示し、高濃度エタノールのもとで増殖するために親水基の調節が大きな役割をはたしていると考えられた。

Table 1-11. PC and PE contents in the cells grown in the presence of fatty acid and ethanol

Fatty acid	Ethanol (%)	Content(mg/g)		
		PC	PE	PC/PE
16:0	0	1.64	2.06	0.80
	4	0.81	1.01	0.80
	8	0.97	0.69	1.41
18:2	0	3.94	1.68	2.34
	4	2.47	0.97	2.55
	8	1.97	0.22	8.95

Abbreviations:PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine.

#### 第4節 考察

生醗中の乳酸菌は、低温培養において著量のリノール酸を取り込んで利用し、リノール酸にはこれらの乳酸菌に対する増殖促進効果が認められた(Fig. 1-1)。このことは、他の多くの乳酸菌が生育できない低温で増殖していく要因の一つになっていると考えられ、今後の検討が必要であろう。また、硝酸還元菌 *Pseudomonas* をはじめ、多くの微生物において、低温環境では脂肪酸に不飽和型の増えることが知られている(22)。このことから、生醗中に存在するいわゆる幕下菌についても、リノール酸取り込みの影響を考える必要がある。

酒母中の遊離脂質のほとんどは遊離脂肪酸とトリグリセリドであったが、乳酸菌によるリノール酸の取り込みに伴う減少によって、それに続いて増殖する生醗酵母のリン脂質脂肪酸組成は、リノール酸を殆ど含まずパルミチン酸に富み、速醗醗のそれと大きく異なっていた。醗中の酵母では、速醗醗、生醗のいずれの酒母を用いて仕込んだ場合にも、酒母酵母に比べて全体にパルミチン酸またはステ

アリン酸含量が増えていた。これは、酵母がエタノール存在下に増殖するとき、培地中にパルミチン酸が存在することによってリン脂質中のパルミチン酸含量が顕著に高くなることから、段仕込によってエタノール存在下に増殖する際にパルミチン酸を利用した結果と考えられる。これらのことを考え合わせるとき、パルミチン酸含量とエタノール耐性との関連性を示唆していると考えられ、これについては第2章ならびに第3章で検討する。

リノール酸に富むリン脂質ではPC/PE比が大きくなることから、生醗と速醗醗、およびそれぞれの醗中の酵母は、脂肪酸組成とともに、PC/PE比によっても区別することが出来た。アシル基としてリノール酸を多く含むリン脂質は、リノール酸の二つの二重結合によって疎水領域の空隙が大きくなるため、それに見合っ親水基についても大きな塩基であるコリンがより多く配位するものと推察される。エタノール存在下に増殖することによりPC、PEは減少し、PE含量がより減少するためにPC/PE比が大きくなる傾向が認められた。特に、8%エタノールの存在下では、PC/PE比は8.95と異常に大きな値を示した。このことから、エタノール存在下の増殖において、リン脂質親水基の調節が大きな役割をはたしているものと推察される。Roweは、高エタノールのもとではPCとPEが相分離を起こし、その境界領域では膜透過性に影響があらわれることを示唆している(23)。相分離はPC/PE比や温度に影響され、脂肪酸不飽和度も影響すると考えられているが(23)、PC/PE比の増大は、膜の相分離の全体量を小さくするうえで効果があると考えられる。

吉沢らも報告しているように(24)、エタノール存在下に増殖した菌体では、リン脂質量の小さくなる傾向が認められた。*E. coli*においても、エタノールを含む培地で増殖するとき、リン脂質量が減少し、膜タンパク質量が増大することが報告されている。この変化によって、細胞内物質が漏出する脂質膜領域が小さくなるので、エタノールに起因する膜流動性の増大を部分的に補償するために効果があると考えられている(25)。酵母においても、今後の詳細な検討が必要と考え

られる。

## 第5節 要約

リノール酸は、パルミチン酸とならんで酒母中の主要な遊離脂肪酸であったが、生醗では乳酸菌によって取り込み利用され、リノール酸は著しく減少し、パルミチン酸の比率が増大した。また、リノール酸は生醗に生育する乳酸菌に対し、増殖促進作用を示し、低温下で取り込み量は増大した。このような環境の遊離脂肪酸組成の違いを反映して、速醗醗酵母では、リン脂質脂肪酸に占めるリノール酸が30~50%におよぶのに対し、生醗酵母では6%以下であり、パルミチン酸、ステアリン酸含量が大きくなった。

生醗、速醗醗、及びそれぞれの酒母を用いた清酒醗中の酵母の脂質組成の変化を見ると、リン脂質量は大きな変化をしていないのに対し、TG量は清酒醗の酵母増殖期に著しく減少していた。速醗醗を用いた清酒醗においては、PE中のリノール酸含量は酒母中での30.6%が6~9%に下がったものの、PC中では酒母中での48.8%が26~30%に低下したにとどまった。清酒醗中における4~5回の細胞分裂にもかかわらず、PC中のリノール酸量の減少が小さいのは、酒母酵母の細胞内TGが清酒醗における増殖初期に利用される結果と考えられた。他方、生醗酵母のリン脂質中のリノール酸は5.5%であったが、清酒醗においても同様に5~10%と低い値を示した。このようにリノール酸含量が増大していないのは、清酒醗の酵母増殖期に、米、米麹からリノール酸の溶出が十分に進んでいないためと考えられた。また、醗では、酵母はエタノール存在下に増殖するために、パルミチン酸含量の増大する傾向がリン脂質全体に認められた。リノール酸がリン脂質アシル基として利用されるとき、PC/PE比を大きくする傾向が認められた。このため、生醗の酵母のPC/PE比は0.67であるのに対し、速醗醗では1.62となり、清酒醗の間

においても同様の差異が認められた。このように、生醗と速醗は、その清酒醗においてもリン脂質脂肪酸組成とPC/PE比において相違していた。

## 第2章 生醗酵母の特性に及ぼすリン脂質脂肪酸の影響

### 第1節 緒言

生醗で育成された酵母は、温み取りと呼ばれる加温操作に強く、枯らしと呼ばれる長期保存での生存率が高いことが知られている(1)。また、温み取りの効果として、1)多酸、高アルコールの成分下で高温(30℃)を経過させることにより、雑菌や野生酵母を淘汰すること、2)酵母にアルコール耐性を付与して長期間の枯らしに耐えさせることなどがあげられているが(26)、詳細な検討は行われていない。

生醗は乳酸菌などの微生物遷移を伴う酒母製造法であるために、一般に製造されている速醗と酵母の増殖環境が異なり、酵母の生理的性質にも影響を及ぼすものと考えられる。そのひとつとして、酒母中の遊離脂肪酸が脂質合成に用いられるために、速醗酵母のリン脂質の主要脂肪酸はリノール酸であるのに対して、生醗酵母においてはリノール酸はほとんど見いだされず、パルミチン酸を多く含むことを第1章で述べた。

この章では、酵母リン脂質の脂肪酸組成の違いが、温み取りおよび枯らしに及ぼす影響について検討し、生醗について言われている特性の説明をこころみる。

### 第2節 実験方法

#### 1. 使用菌株と培養条件

工業規模で育成された酒母には、*Saccharomyces cerevisiae* Km601を用いた。その他は協会7号酵母(K-7)を供試し、増殖培地として、GYP培地(グルコース5%、酵母エキス1%、ポリペプトン1%)を用いた。他の培地を用いた場合はそのつど

記載した。パルミチン酸(16:0)、リノール酸(18:2)、オレイン酸(18:1)、またはステアリン酸(18:0)を含む培地を調製する際には、Chenの方法により(8)脱脂した牛血清アルブミン(最終濃度0.1%)とともに、それぞれ0.5mMになるように添加した。培養は、ことわらない限り20℃で定常期まで行った。

## 2. 発酵活性の測定

供試菌体は脂肪酸を添加した麹汁培地(Brix8)にて培養後、遠心分離により集菌し2回蒸留水で洗浄した。2%グルコースを含むM/15リン酸緩衝液(pH4.2)に約 $10^8$  cells/mlになるように菌体を懸濁し、窒素ガス置換後、 $O_2$ アップ・テスター(大洋科学工業)により10℃における二酸化炭素生成量を測定した。Hayashidaらの方法(27)に従って二酸化炭素生成量から、発酵活性を $Q_{CO_2}$ ( $\mu$ l  $CO_2$ /h/ $10^8$  cells)として求めた。この際の酵母数は、寒天平板法により求めた菌体中の生菌数の4回の平均値を用いた。

## 3. エタノール耐性試験

4℃において遠心分離により集菌した菌体を、16~20%エタノールを含むGYP培地、または20%エタノールを含むMcIlvaine緩衝液(pH4.2)中に懸濁し、15℃に静置した。経時的にサンプリングし、適宜希釈後GYP寒天平板に塗抹培養を行って、初発菌数に対する生存率を求めた。また、培養菌体を0~20%エタノールを含むGYP培地に菌密度約 $2 \times 10^8$ /mlになるように懸濁し、15℃において静置後、佐見らの方法(28)に準拠し、0.01%メチレンブルーを含む0.1Mグリシン緩衝液(pH10.6)中で酵母を染色し、染色率から生存率を求めた。

## 4. 耐熱性試験

遠心分離により集菌後2回洗浄した培養菌体を蒸留水に約 $10^7$ /mlになるように懸濁し、52℃において緩やかに振とうした。5分後にサンプリングし、直ちに冷水で希釈後GYP培地寒天平板に塗抹培養を行い、初発菌数に対する生存率を求めた。

## 5. 発酵試験

Hayashidaらの方法(29)に従い、完全合成培地を基礎培地として補糖により発酵を継続させた。0.5mM脂肪酸を含む200mlの培地に $3 \times 10^6$ /mlになるようにK-7株を接種後、発酵栓(30)を通したシリコンゴム栓でフラスコに栓をした。発酵栓の中には二酸化炭素とともに逸出する水分を補足するために40%硫酸を入れておき、二酸化炭素の放出に伴う全体の重量の減少量から、エタノール生成量を推定した。

## 6. 温み取り処理

酒母における温み取りに変わる処理として、培養菌体を遠心分離により集菌後、エタノール12%を含むGYP培地(グルコース2%、酵母エキス1%、ポリペプトン1%)に懸濁し、30℃に一定時間静置した。以降これを温み取り処理と呼ぶ。

## 7. シクロヘキシミド添加試験

温み取りによって誘導されるタンパク質が酵母のエタノール耐性に及ぼす影響を見るために、温み取り処理、またはエタノール耐性試験においてタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを $2 \mu$ g/mlになるように添加した。

## 8. 菌体成分の漏出量の測定

遠心洗浄した菌体を0~20%エタノールに10mg-dry weight/3mlになるように懸濁し、35℃に2時間、または15℃に24時間静置後、ただちに氷冷し、遠心上清をフィルター(Shodex MT)でろ過して試料とした。菌体を蒸留水に懸濁し10℃においたときの上清をブランクとして、260nmにおける吸光度、カリウム濃度および全リン濃度の測定を行った。なお、カリウムは原子吸光光度計(日立Z-8100)を用い炎光分析により、全リンは過ヨード酸法により定量した(31)。

## 第3節 実験結果

### 1. 温み取り耐性に及ぼす脂肪酸の影響

生醗の酵母は、温み取りと呼ばれる加温操作に対して強いと言われている。ま

た、上原、山村は、*S. cerevisiae*が増殖できない40℃においても、パルミチン酸、またはオレイン酸の添加により菌体増殖が可能になることを報告している(4)。そこで、菌体膜脂質の脂肪酸組成が耐熱性に及ぼす影響を見るために、脂肪酸を含む培地で培養された菌体の耐熱性を調べた。蒸留水中で52℃、5分間処理した後の生存率は、Table 2-1に示すように二価不飽和脂肪酸であるリノール酸を含む菌体において著しく低下した。

Table 2-1. Effect of fatty acid on the viability of *S. cerevisiae* after lethal heat shock.

Fatty acid	Viability (%)
16:0	2.3±0.4
18:0	7.8±5.0
18:1	2.9±0.4
18:2	0.29±0.15

温み取りは、エタノール存在下における加温処理であるので、脂肪酸を含む完全合成培地を用いた発酵試験の途中で発酵温度をシフトして、培地中の脂肪酸が生存率の低下に及ぼす影響をみた。すなわち、二酸化炭素の生成量から換算してエタノール濃度が12.8~13.0%になった時15℃から30℃に移し、生菌数の経時変化を測定した。Fig. 2-1に示すように、二価不飽和脂肪酸であるリノール酸を添加した場合には、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸、飽和酸であるパルミチン酸、ステアリン酸に比べて生菌数の低下が顕著であった。

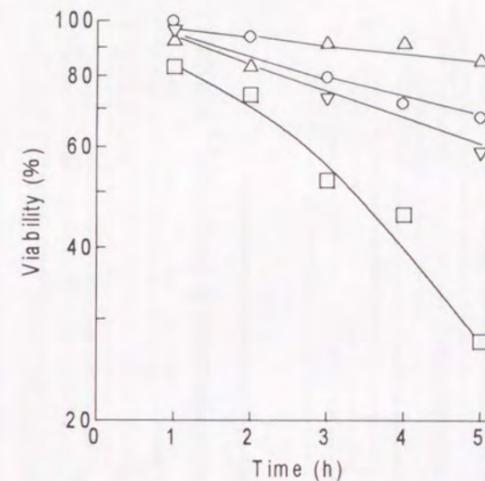


Fig. 2-1. Effect of fatty acid on the viability of *S. cerevisiae* K-7 after raising the temperature from 15°C to 30°C. Symbols: ○, palmitic acid; △, stearic acid; ▽, oleic acid; □, linoleic acid.

発酵途中における高温シフトによって認められた生存率の違いが、菌体の脂肪酸組成の違いに起因することを確認するため、脂肪酸を添加して培養した菌体を洗浄後、0~12%のエタノールを含み脂肪酸を含まないGYP培地に懸濁し、30℃、1時間処理後の生存率を求めた。結果をFig. 2-2に示す。パルミチン酸添加培地で培養することによりパルミチン酸を多く含む菌体では、実験範囲において生存率の違いは認められなかった。他方、リノール酸添加培地で培養することによりリノール酸を多く含む菌体では、エタノール濃度9%以上において平均値の差の検定を行うことにより有意な生存率の低下が認められた。

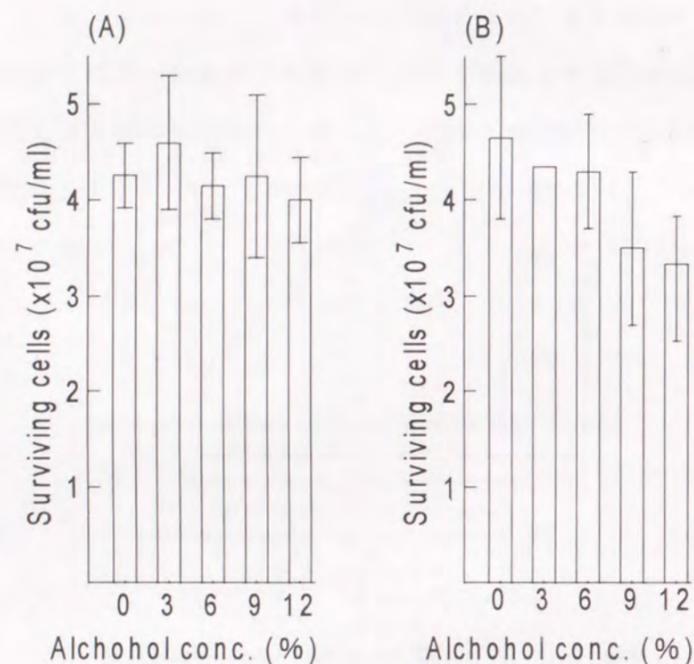


Fig. 2-2. Effect of ethanol concentration on viability of yeast at 30°C for 1 hour. Cells grown in GYP broth supplemented with 0.5 mM palmitic acid(A) or linoleic acid(B) were resuspended in GYP broth containing 12% ethanol, and incubated at 30°C for 1 hour. Diluted samples were plated by the spread plate method in four-fold experiments. Vertical bars indicate 95% confidence limits.

リン脂質膜の脂肪酸不飽和度が小さいほど、また炭素鎖長が長いほど、高温下で膜の流動性は低く保たれ、膜透過性の小さいことが一般に知られている。そこで、温み取り操作のような条件において同様のことが言えるかを検討した。パルミチン酸またはリノール酸を添加した培地で生育した酵母菌体からの物質漏出の違いをみるため、種々の濃度のエタノール存在下に静置したときのカリウム、全リンおよび260nm吸収物質の漏出量を測定し、Fig. 2-3に示す結果を得た。15°Cに24時間おいた際には、高濃度エタノール(14~20%)の存在するときにはじめて漏

出が認められたが、温み取り温度に近い35°Cに2時間おいた際には、エタノール0%においても漏出が認められ、エタノール濃度が高くなるに従い漏出量は増大した。また、リノール酸を添加して培養した菌体は、パルミチン酸に比較してほぼ2倍の漏出量を示した。

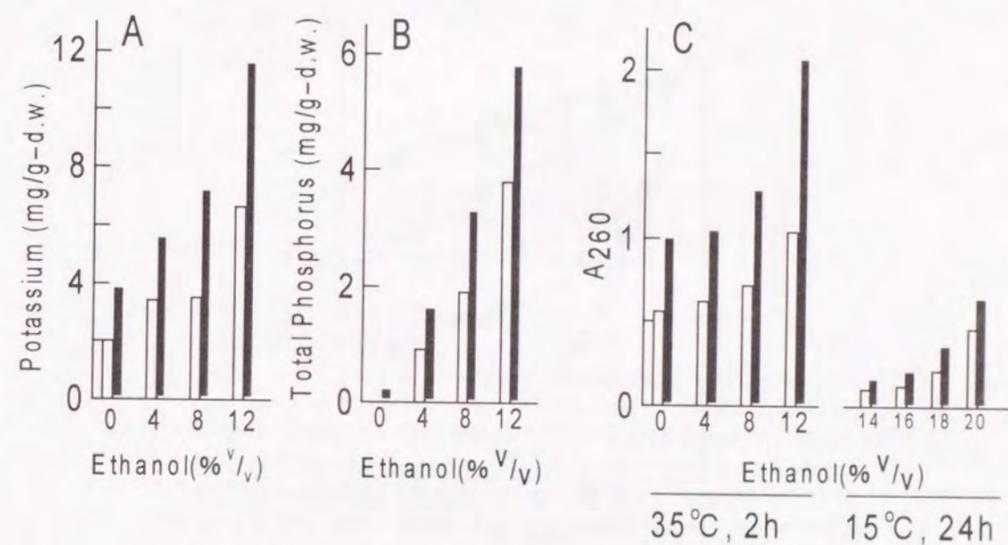


Fig. 2-3. Leakage of potassium, total phosphorus, and substances absorbable at 260 nm from yeast in the presence of ethanol. 10 mg portions of yeast cells grown in medium supplemented with palmitic acid(open bars) or linoleic acid (striped bars) were suspended in 3 ml of ethanol solution at various concentrations, and allowed to stand for 2 hours at 35°C. Leakage of potassium(A), total phosphorus(B), and substances absorbable at 260 nm(C) were read against blanks of suspensions in distilled water at 10°C.

## 2. 温み取りによって誘導されるエタノール耐性

パルミチン酸を添加して培養した菌体を、12%エタノール存在下に30°C、1時間温み取り処理を行った後、エタノール耐性試験に供し、生存率の経時変化を見た結果をFig. 2-4に示す。対照としてエタノールを含まない条件で温み取り処理

を行ったが、この場合の死滅曲線に比べて、エタノール濃度18%、20%のいずれの培地中においても死滅曲線の勾配は緩やかになった。なお、温み取り処理時間が30分以下では明瞭な効果が認められなかった(データ省略)。これらの結果から、エタノール存在下に一過的に高温に曝すことは菌体にエタノール耐性を付与すると考えられる。

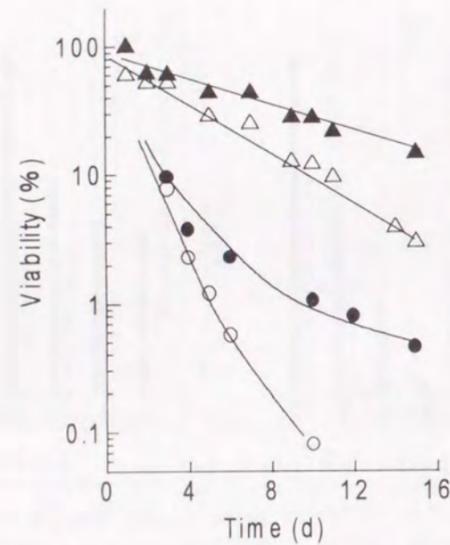


Fig. 2-4. Effect of *nukumitori* treatment on ethanol tolerance of *S. cerevisiae*. Cultures were incubated at 20°C in growth medium supplemented with 0.1% defatted albumin and 0.5mM palmitic acid for 4 days. Harvested cells were suspended in GYP medium containing 12% ethanol, incubated at 30°C as *nukumitori* treatment or at 15°C as a control for 1 hour, and resuspended in the same medium except for a higher ethanol content. The rate of survival at a concentration of 18(▲, *nukumitori*; △, control) and 20% ethanol(●, *nukumitori*; ○, control) was expressed as the percentage of the viable to the initial cell count by the spread plate method.

つぎに0~12%エタノールの存在下で温み取り処理を行い、この時のエタノール濃度がエタノール耐性試験での生存率に及ぼす影響について検討した。結果はFig. 2-5に示すように、実験範囲内ではエタノール濃度が大きいほど、エタノール耐性も大きくなる傾向が認められた。

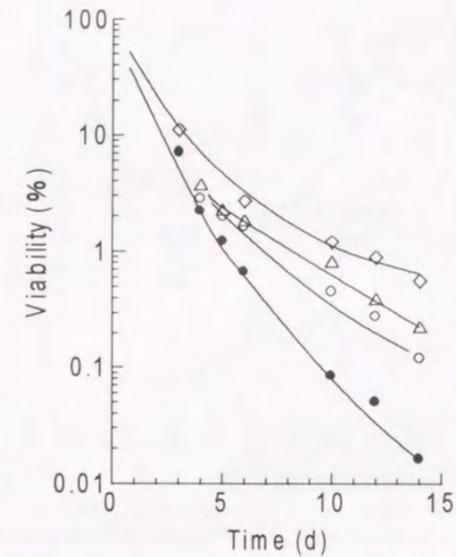


Fig. 2-5. Effect of ethanol concentration in *nukumitori* treatment on the viability of yeast cells in the presence of 20% ethanol. Experiment conditions similar to those described in the legend to Fig. 2-4 were used except that various concentrations of ethanol(●, 0%; ○, 3%; △, 6%; ◇, 12%) were used for the *nukumitori* treatment.

温み取り処理によって、あらたなタンパク質が合成された結果エタノール耐性が増大することを確認するために、タンパク質の生合成阻害剤であるシクロヘキシミド(2μg/ml)の添加の影響をみた。Fig. 2-6に示すように、温み取り処理前に添加した場合は、エタノール耐性試験におけるメチレンブルー非染色率(生存菌の比率)が温み取りを行わない場合と同じ推移を示したが、温み取り処理後に添加すると、シクロヘキシミドを添加しない場合とほぼ同様の高い非染色率を示した。これらのことから、温み取り処理によって誘導されるストレスタンパク質が、エタノール耐性試験における死滅速度の減少に寄与しているものと考えられた。

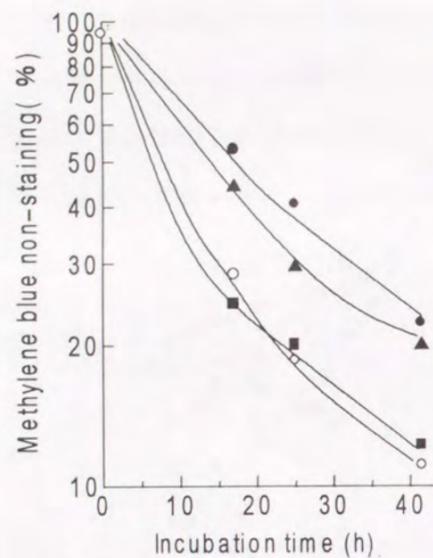


Fig. 2-6. Effect of cycloheximide on methylene blue non-staining of *nukumitori*-treated cells in the presence of 20% ethanol. Experimental conditions similar to those described in the legend to Fig. 2-4 were used except for the addition of cycloheximide. The degrees of methylene blue non-staining of the cells in 20% ethanol were examined over a 41-h period. Symbols: ○, control cells; ●, *nukumitori*-treated cells; ▲, cycloheximide (2 μg/ml) was added 3 hours after *nukumitori* treatment; ■, cycloheximide was added just before *nukumitori* treatment. The means of four-fold experiments were plotted.

### 3. 生醗酵母の長期保存性

工業規模において製造され、酵母が最大増殖量に達した生醗と速醗を10℃にて保存し、約2ヶ月間にわたって酵母生菌数とエタノール濃度を測定した。結果をFig. 2-7に示す。いずれの酒母においても指数的に生菌数の減少が認められたが、速醗中の酵母の生存率が9週間後には0.6%になったのに対し、生醗中の酵母の生存率は12.6%ときわめて高い値を示し、生醗の長期保存性を確認できた。それと同時に、生醗においては菌体あたりのエタノールの生成速度の小さい傾向が観察された。

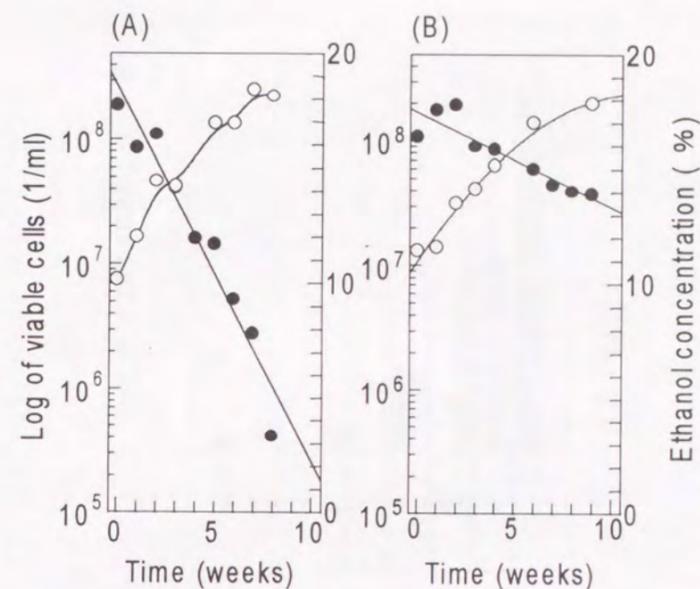


Fig. 2-7. Time course of ethanol production and viability of yeast in *moto* (seed mash) during the resting period. Ripened *moto* was preserved at 10°C, and the ethanol concentration (○) and number of surviving yeast cells (●) was determined for 9 weeks. (A), *Sokujo-moto* (conventional procedure); (B), *kimoto* (traditional procedure).

### 4. 発酵力に及ぼす脂肪酸の影響

Fig. 2-7において速醗と生醗では菌体あたりのエタノール生成速度に違いが認められた。第1章で述べたように、速醗酵母と生醗酵母ではリン脂質脂肪酸組成に大きな違いがあることから、酵母の発酵力に及ぼす脂肪酸組成の影響について検討した。脂肪酸を含む麹汁培地で培養した菌体について、その発酵力を10℃において測定した。結果をFig. 2-8に示す。不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸を含む培地で培養された菌体の $Q_{82}$ は対照に比べて大きな値を示したのに対し、飽和脂肪酸であるパルミチン酸の場合には $Q_{82}$ は小さな値になった。

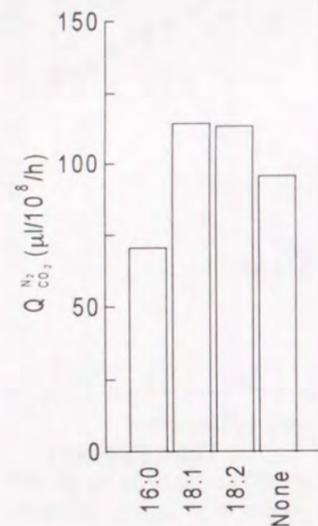


Fig. 2-8. Effect of fatty acid on fermentative activity of yeast cells. Cells grown in *koji* extract (Brix 8) supplemented with 0.5 mM fatty acid, were harvested, washed with distilled water twice, and resuspended in 1/15M phosphate buffer including 2% glucose (pH 4.2) to about  $10^8$  viable cells per ml. Air in the flask was replaced by pure nitrogen gas, and the  $CO_2$  gas liberated was read at  $10^\circ C$  with agitation. The  $Q_{CO_2}$  was calculated from the output on the basis of fermentative activity per viable cell number.

##### 5. エタノール耐性に及ぼす脂肪酸の影響

培養菌体をエタノールを含むGYP培地に置換培養したとき、Fig. 2-9に示すように、16%以上のエタノール存在下においてパルミチン酸添加培養菌体はリノール酸添加培養菌体に比べてメチレンブルー染色率が低く、高い生存率を示した。

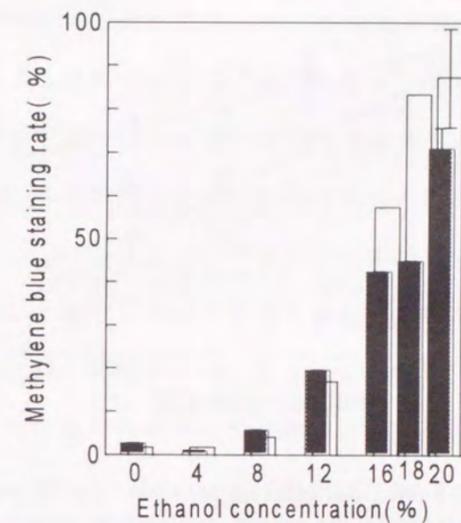


Fig. 2-9. Viability of cells after incubating in GYP medium supplemented with ethanol over a range from 0 to 20%, with a cell density up to  $2 \times 10^8/ml$ . Viability of cells enriched with palmitic acid (dark bar) or linoleic acid (blank bar) was measured by methylene blue staining after incubation at  $15^\circ C$  for 72 hours. Vertical bars indicated 95% confidence limits for four-fold experiments.

さらに、20%エタノールを含むMcIlvaine緩衝液 (pH4.2) 中に、パルミチン酸添加培養菌体、またはリノール酸添加培養菌体を懸濁し、 $15^\circ C$ において生存率の経時変化を見たところ、Fig. 2-10に示す結果を得た。パルミチン酸添加培養酵母は、リノール酸添加培養菌体に比べて明らかに小さな比死滅速度を示した。エタノールを含む緩衝液中でこのような差異が認められることから、酵母の細胞構造の違いがエタノール耐性の差異となって現れていると考えられる。すなわち、低温下でも高エタノール存在下において膜バリアー能に違いが生じて、エタノール耐性の差異となっている可能性が考えられる。

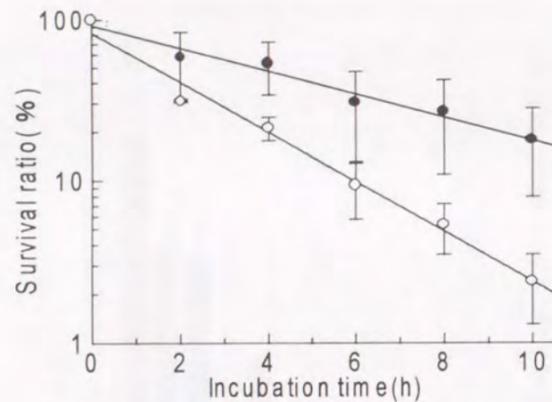


Fig. 2-10. Survival curves for cells of *S. cerevisiae* in buffered ethanol. Cells cultivated in the medium supplemented with 0.5 mM palmitic acid(●) or linoleic acid(○) were suspended in McIlvaine buffer containing 20% ethanol and incubated at 15°C. The viable cell count was measured by spreading dilutions of cells on GYP agar medium. Vertical bars indicate 95% confidence limits for four-fold experiments.

#### 第4節 考察

速醸醗に比べて、生醗では枯らし中のエタノール濃度は低く推移し、酵母の高い生存率の維持に寄与していると考えられる (Fig. 2-7). 同様の現象を佐藤らも認め (32), 酒母の成分でエタノール濃度が酵母の生存率に最も大きく影響することを報告している (33). また、リノール酸は、Hayashidaらも報告しているように (3) 培養菌体の  $Q_{10}$  を増大させ、パルミチン酸は減少させることから (Fig. 2-8), 酒母の枯らし中にみられる発酵量の違いは、菌体膜脂質の脂肪酸組成の違いによって説明されると考えられる。

酵母は高温下では脂肪酸組成を変化させ、適正な膜の流動性を維持するために不飽和脂肪酸が減少することが知られている (34-36). また、脂質二分子膜の物質透過性は、アシル鎖の不飽和度とともに増大することが知られている (37). こ

れらのことは、パルミチン酸添加が、リノール酸添加に比べて膜バリアー能を高くし、耐熱性を与える要因となっていることを示している。増殖温度においてもエタノールの存在下では、パルミチン酸添加培養菌体の方が細胞内物質の漏出量は小さく、高い生存率を維持しており、生醗酵母が温み取りに強い要因になっていると考えられる。このことは、エタノールの膜脂質にもたらす作用が、高温効果に類似していることを示していると考えられる。さらに、15°Cにおいても、高濃度エタノール中では、同様にパルミチン酸添加培養菌体がりノール酸添加培養菌体より有意に高い生存率を示し、生醗酵母が枯らしに強いことの一つの要因になっていると考えられた。Takeuchiと Ouchiは、0~10%のプロパノールによって解糖系酵素は影響されるが、ATP,  $NAD^+$ , マグネシウム, 無機リン酸を補った脱膜細胞に比べて、intact cellではいっそうプロパノールに対して感受性が大きいことを報告している (38). また、*Zymomonas mobilis*においては、エタノールにより、必須のコファクターやコエンザイムの漏出が観察され、これらの物質の漏出によってエタノールによる発酵阻害を説明できると考察されている (39). これらのことから、高濃度エタノールの存在下において膜のバリアー能の大きいことは、必須のコファクターやコエンザイムの漏出を抑えることにより、菌体の生存率の維持に貢献していると考えられる。したがって、リノール酸に比べて、パルミチン酸を多く含む菌体が高濃度エタノールのもとで高い生存率を示すのは、エタノール存在下での膜バリアー能の差異を反映した結果である可能性が考えられる。第1章に述べたように、エタノール存在下に酵母が増殖するとき、パルミチン酸を供与すると著しくリン脂質脂肪酸に占めるパルミチン酸含量が増大し、殆どエタノールによる増殖阻害を示さないことも、この可能性を支持していると考えられる。エタノールによる膜透過性の増大とリン脂質脂肪酸の影響については第3章で検討する。

温み取り処理を行った菌体はその後のエタノール耐性試験において高い生存率

を示し (Fig. 2-4), 生醗における温み取りも枯らし中の生存率に影響を及ぼしているものと考えられた。シクロヘキシミド添加実験から, エタノール耐性に関わるタンパク質の合成は大部分温み取りの間に行われていると考えられ, この長期間にわたってエタノール耐性に寄与するストレスタンパク質についても, 今後の検討課題と考えられる。

#### 第5節 要約

パルミチン酸を添加して培養した酵母菌体は, リノール酸を添加した培養菌体に比べて, 大きな耐熱性を示した。同様に, エタノール存在下に30℃においたときにも高い生存率を示し, この時の菌体からの物質漏出量は, リノール酸添加培養菌に比べて顕著に小さかった。これらのことから, 生醗で行われてきた温み取りを速醗で行ったとき, 酵母の死滅率が增大する理由として, 酵母の脂肪酸組成の相違による細胞内物質の漏出量の差異が示された。

温み取り処理によって, 酵母のエタノール耐性は大きくなり, 温み取り処理の間にシクロヘキシミドにより蛋白合成を阻害すると, エタノール耐性の増大は消失することから, 温み取り処理によって誘導されるストレスタンパク質の寄与が考えられた。

速醗に比べて, 生醗では長期保存によっても高い酵母生存率を維持することを酒造現場の酒母を用いて確認した。9週間の枯らしの後に速醗では0.6%の酵母生存率になったのに対し, 生醗では12.6%の生存率を示した。また, 速醗の発酵経過に比較して, 生醗ではエタノール濃度の穏やかな上昇が認められた。不飽和脂肪酸であるオレイン酸, リノール酸を含む培地で培養された菌体の $Q_{10}$ は対照より大きな値を示すのに対し, 飽和脂肪酸であるパルミチン酸の場合には $Q_{10}$ は小さな値となることから, 酒母の発酵経過の違いは, 酵母の発酵力の違い

を反映していると考えられた。また, 16~20%エタノール中で, リノール酸添加培養酵母に比べて, パルミチン酸添加培養酵母は高い生存率を示し, 酒母酵母の長期保存性の違いは, 脂肪酸組成の差異によると考えられた。

### 第3章 膜のバリアー能に及ぼすリン脂質脂肪酸の不飽和度の影響

#### 第1節 緒言

生醗と速醗では、酵母の脂肪酸組成が異なり、それによって生醗酵母の特性である長期保存性が、エタノール耐性および発酵量の違いから説明できることを示した。また、脂肪酸組成の違いによって、温み取り条件下では細胞膜のバリアー能が異なり、温み取りに対する耐性の差が現れることを示した。この章では、高エタノールに対するエタノール耐性にも、酵母の脂肪酸組成が影響していることを確認し、これが細胞膜のバリアー能の違いによるかどうかについて検討した。さらに、リボソームを用いて、高エタノール存在下におけるバリアー能におよぼすリン脂質脂肪酸の不飽和度の影響について検討した。

#### 第2節 実験方法

##### 1. 供試株と培養条件：

GYP培地(グルコース5%、酵母エキス1%、ペプトン1%)を基本培地として用いた。酵母は清酒酵母協会7号株を用い、特に述べない限り、1/100量をGYP培地に接種し、20℃、4日培養した。添加脂肪酸の効果を見るときには、Chenの方法(8)により脱脂した0.1%牛血清アルブミン(シグマ)を分散剤として、0.5mM脂肪酸を培地に加えた。さらにステロールの添加効果を見るときには、完全に分散させるために0.1%Brij58を分散剤として1mMエルゴステロールを加えた。

##### 2. 生存率の測定：

培養菌体を4℃において遠心集菌し、蒸留水で2回洗浄した。菌体を20%エタノールに懸濁し、スクリーキャップをゆるめて懸濁液を15℃に静置した。生存

菌数は、28℃においてGYP寒天培地に平板培養して計数した。4回の重複実験における生存菌数の測定を60時間にわたって行い、生存率を求めた。

##### 3. 細胞内ヌクレオチドの拡散の測定：

培養菌体を4℃において遠心集菌し、上清の260nmにおける吸収が無視できるまで蒸留水で洗浄した。その後、菌体を0~20%エタノール溶液に定容になるように懸濁して、15℃において経時的にサンプリングを行った。低速遠心分離により細胞を除去した後、上清の260nmと280nmにおける吸光度を、光路長1cmで測定し、測定値がほぼ一定の値を示すまで継続した。リボヌクレオチド濃度は以下の式により算出した(40)。

$$\text{リボヌクレオチド}(\mu\text{g/ml}) = (11.87 \cdot A_{280} - 10.4 \cdot A_{260}) \times 100/9 \quad (3-1)$$

##### 4. 脂質抽出と脂肪酸分析

既往の方法により、凍結乾燥菌体から全脂質を抽出してTLCにより分離し、脂肪酸メチルエステルを調製後GLC分析を行った。

##### 5. カルセイン封入リボソームの調製

リン脂質については、大豆製ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンは Shigma Chemical Companyより、dipalmytoyl phosphatidylcholineと dipentadecanoyl phosphatidylethanolamineは Avanti Biochemical Inc.より購入した。カルセイン(2',7'-[(bis[carboxymethyl]-amino)methyl]-fluorescein)は和光純薬工業より購入した。多重膜リボソームは標準的な方法により調製した(41)。PCとPE(合計5mg)のクロロホルム溶液を窒素ガス気流下に乾燥し、スクリーキャップ式試験管内にリン脂質の薄膜を作成した。これに100μMカルセインを含む10mMトリス緩衝液(pH7.3)500μlを加え、40秒間隔に20秒ずつ10回ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、カルセインの封入された多重膜リボソームを形成させた後、3000 x g、10分間遠心分離して沈殿させ、緩衝液で洗浄して用いた。

## 6. リポソームのカルセイン透過性の測定

リポソーム懸濁液50 $\mu$ lを、0~17.5%のエタノールと200 $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>を含む10mM トリス緩衝液(pH7.3)2.55mlに希釈し、16 $^{\circ}$ Cにおける懸濁液の蛍光強度( $F_n$ )を蛍光分光計PF-5000(島津製作所)を用いて連続測定した。この際、カルセインの励起波長として490nm、蛍光波長として520nmを用いた。リポソームに封入されていないカルセインはCo<sup>2+</sup>とキレートを形成し蛍光が消失するので、蛍光はリポソーム内部および外部の非消光画分から検出される合計となる。引き続き、20%トリトンX-100を50 $\mu$ l添加し、蛍光を再度測定した。これによって、リポソームは破壊され、残存する蛍光( $F_a$ )は消光されないカルセインの平衡濃度によるものである。したがって、封入カルセインの蛍光強度は以下の式によって示される。

$$(F_n - F_a \cdot r) / (F_0 - F_a \cdot r) \times 100 = \text{trapped calcein}(\%) \quad (3-2)$$

ここで、 $F_0$ は初発蛍光 $F_n$ をあらわし、 $r$ はトリトンX-100の添加による希釈ファクターをあらわしており、この場合1.02となる。

### 第3節 実験結果及び考察

#### 1. リポソームのバリアー能に及ぼすリン脂質アシル基の飽和度の影響

高濃度のエタノールが存在するとき、リン脂質膜のバリアー能におよぼすリン脂質脂肪酸組成の影響を、リポソームを用いて以下のように検討した。

大豆PC-dipentadecanoyl PE(1:1)からなるリポソームに封入されたカルセインの蛍光強度(%)を、炭素鎖長の異なる種々のアルコール存在下に経時的に測定し、リポソーム膜のバリアー能に及ぼすアルコールの効果を見た。0.86Mメタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールを用いた際の蛍光変化をFig. 3-1(A)に示す。蛍光減少の勾配はアルコールの鎖長に依存しており、ブタノールによる急激な蛍光減少はリポソームが破壊されたことによると考えられた。アルコールの炭

素鎖長が大きくなるにともなう勾配が大きくなるのは、リポソームのアシル基間の疎水的相互作用におよぼすアルコールの影響がその炭素鎖長に依存して大きくなり、バリアー能が低下した結果と考えられる。

つぎに、0~17.5%エタノールを含む緩衝液中での蛍光強度(%)の経時変化を見たところ、Fig. 3-1(B)に示すように、エタノール濃度が大きくなるにしたがい勾配が大きくなった。小さなサイズのリポソームに依存すると考えられる大きな減少が初期に認められたが、その後勾配は片対数グラフ上に直線で示された。そこで以下の実験では、エタノール濃度が17~18%に達するとき清酒醪における発酵が急に緩慢になることを考慮に入れて、17.5%のエタノールを含む緩衝液中で蛍光強度の測定を行い、20分以降の蛍光減少の経過を直線に近似して、その勾配を減少速度定数として評価することにした。

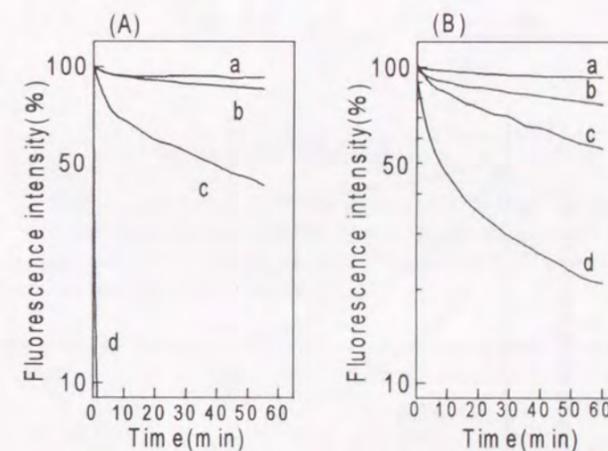


Fig. 3-1. Effect of alcohol on fluorescence of trapped calcein. (A) Liposomes composed of soybean phosphatidylcholine, dipentadecanoyl phosphatidylethanolamine (weight ratio 1:1) formed in Tris-HCl buffer (pH 7.3) containing 100  $\mu$ M calcein were added to 2.55 ml of Tris-HCl buffer containing 200  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub> and 0.86 M n-alcohol (a: methanol, b: ethanol, c: propanol, d: butanol) at zero time. Incubation continued for 60 min at 16 $^{\circ}$ C. (B) Liposomes were added to the buffer containing ethanol (a: 0%, b: 10%, c: 15%, d: 17.5%). Other conditions were the same as described above.

種々の比率でPCとPEからリポソームを調製し、17.5%エタノールの存在の有無が蛍光強度の経時変化に及ぼす影響を見た。大豆PCおよび大豆PEはリノール酸を含むリン脂質として、dipalmitoyl PCとdipalmitoyl PEはそのアシル基に飽和脂肪酸のみを持つリン脂質として用いた。大豆由来のリン脂質の脂肪酸組成をTable 3-1に示す。Fig. 3-2にカルセイン保持率の変化の一例を示す。エタノールが存在しないとき、いずれのリポソームもアシル基の不飽和度の違いに関わらず、高い蛍光を維持した。しかしながら、17.5%エタノールの存在下では、リン脂質の違いによって経時変化に顕著な差が認められた。

Table 3-1. Fatty acid composition of PC and PE originated from soy bean.

	Fatty acid composition (%)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
PC	13.1	0	3.8	11.3	65.7	6.1
PE	17.8	0	2.5	9.0	63.4	7.2

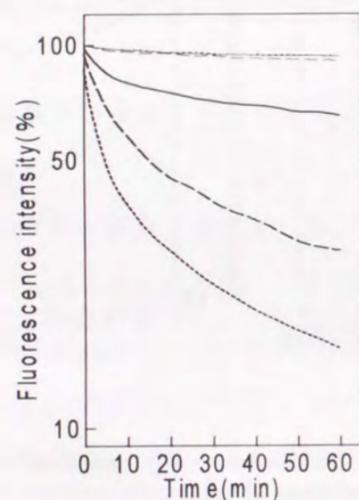


Fig. 3-2. Effect of fatty acyl residues of phospholipids on the fluorescence of trapped calcein. Liposomes were added to the buffer in the presence and absence of 17.5% ethanol (heavy line and light line, respectively). Solid line is di-palmitoyl PC: di-pentadecanoyl PE(1:1), dashed line is soy bean PC: di-pentadecanoyl PE(1:2) and dotted line is soy bean PC: di-pentadecanoyl PE(2:1). Other conditions were the same as described in the legend of Fig. 3-1.

Fig. 3-3に、リポソーム中での飽和脂肪酸のみをアシル基とするリン脂質の割合と、蛍光強度の減少速度定数との関係を示す。アシル基として飽和脂肪酸を持つリン脂質の増加にともない、速度定数が急に小さくなった。また、PC-PE二重膜はPC/PE比によっては、膜内における相分離(lateral phase separation)を起こすことが報告されているが(42)、用いた実験条件の範囲では、PC/PE比は速度定数にほとんど影響しないようにみえた。

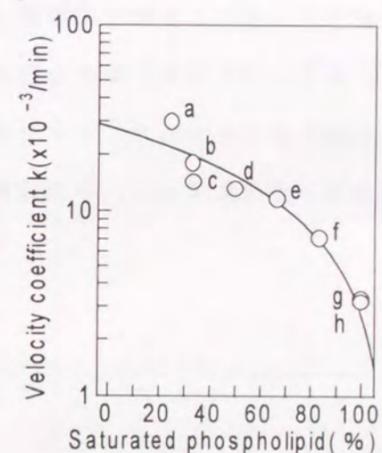


Fig. 3-3. Relationship between the percentage of acyl saturated phospholipid and the velocity coefficient of fluorescence decrease. Liposomes composed of PC and PE as described below were added to the buffer containing 17.5% ethanol.

	PC		PE		acyl saturated phospholipid (%)	PC/PE
	S.B. <sup>a</sup>	di-16:0 <sup>b</sup>	S.B.	di-15:0 <sup>c</sup>		
a	1	1	2		25	1
b	1	1	1		33	2
c	2			1	33	2
d	1			1	50	1
e	1			2	67	0.5
f	1	1		2	75	1
g		2		1	100	2
h		1		1	100	1

<sup>a</sup> originated from soy bean.

<sup>b</sup> di-palmitoyl PC.

<sup>c</sup> di-pentadecanoyl PE.

## 2. 細胞膜透過係数に及ぼす脂肪酸の影響

リボソーム実験から、高濃度のエタノール存在下ではリン脂質アシル基の不飽和度によって、膜透過性に著しい違いのあることがわかった。そこで、リボソーム実験でみられたと同様の違いが、リン脂質以外の構成成分を含む細胞膜の膜透過性においても認められるか検討した。細胞膜にヌクレオチドの輸送系は見いだされていないので、細胞膜を透過した細胞外ヌクレオチドを測定することにより、細胞膜透過性に及ぼすリン脂質アシル基の不飽和度の影響を見積もることができると考えられる。Fig. 3-4に、エタノール溶液に細胞を懸濁し15°Cにおいたときの、上清のヌクレオチド濃度の経時変化を示した。ヌクレオチド濃度の増加は初期に大きく、徐々に緩やかになり平衡値に達して、単純拡散に従っているように見えた。

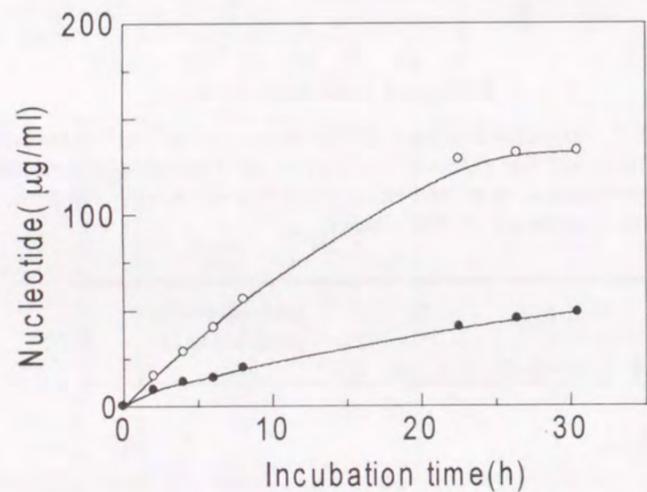


Fig. 3-4. Time course of extracellular nucleotide concentration in cell suspension. Yeast cells were suspended in aqueous solution of ethanol (●:10%, ○:20%) and incubated at 15°C.

それぞれ別に培養した菌体を用いて、細胞懸濁液上清にみられたヌクレオチドの平衡濃度と細胞密度の関係を求めると、Fig. 3-5に示すように直線関係が認められた。このことから、用いた条件下では、再現性のある結果が得られると考えられた。しかしながら、12%エタノール存在下に30°Cで観察すると、初期の急激な増加につづいて平衡に達する傾向を示したが、その後再び穏やかな増加が観察され、核酸の酵素分解とそれにもなう生成ヌクレオチドの膜透過が起こっていると考えられた(データ省略)。

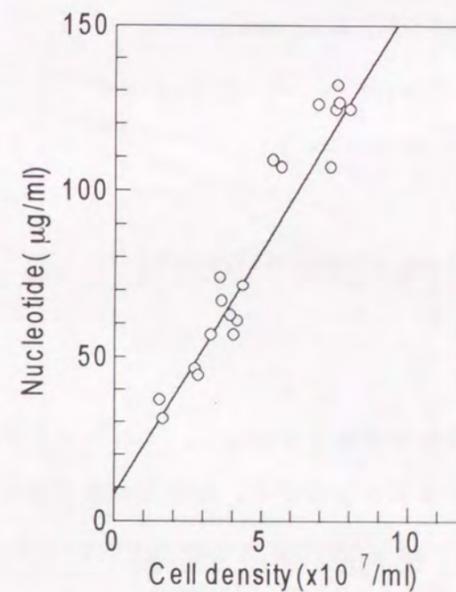


Fig. 3-5. Relation between cell density and the equilibrium in nucleotide concentration. The equilibrium in nucleotide concentration were observed and proportional to cell density over a wide range ( $r=0.9144^*$ ,  $n=21$ ), when cell suspension in 20% ethanol were incubated at 15°C.

拡散モデルでは、細胞外溶質濃度と時間との関係は次の式で示される。

$$\ln(C_e^\infty - C_e) = \ln(C_e^\infty - C_e^0) - (1 + \nu)(A/V_i)P't \quad (3-3)$$

ここで、

$t$  : time (h)

$C_e$  : extracellular solute concentration (mol/cm<sup>3</sup>)

when  $t=0$ ,  $C_e=C_e^0$

when  $t=\infty$ ,  $C_e=C_e^\infty$

$A$  : total surface area of cell membrane (cm<sup>2</sup>)

$V_i$  : total intracellular liquid volume (cm<sup>3</sup>)

$V_e$  : extracellular liquid volume (cm<sup>3</sup>)

$\nu$  :  $V_i/V_e$  (-)

$P'$  : coefficient of membrane permeability (cm/h)

ここで、細胞の長径と短径を顕微鏡下で測定し、それらの平均値を用いて、細胞を楕円体と見なしたときの体積を公式から、また表面積を積分により求め、それぞれ  $5.71 \times 10^{-10}$  cm<sup>3</sup>,  $2.88 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> とした。さらにトーマ氏血球計を用いて求めた 4 回の計数の平均細胞数を乗じて求められる全体積と全表面積を、それぞれ  $V_i$ ,  $A$  とした。

エタノール濃度が 0~20% の範囲において細胞懸濁液を用いてヌクレオチド濃度を経時的に測定したところ、式 (3-3) は、Fig. 3-6(A) に示すようにヌクレオチド濃度の実験データをよく表すことができた。ただし、20% より低いエタノール濃度条件でのヌクレオチド平衡値は、実験を行った時間内で観察されなかったの

で、20% エタノール中における平衡濃度を用いた。エタノール濃度 20% において、直線の勾配は他のアルコール濃度に比べて大きく、エタノール濃度が 15% から 20% の間で膜透過性が急激に大きくなると考えられる。

つぎに脂肪酸の種類の影響を見るため、0.5mM パルミチン酸、またはリノール酸を含む GYP 培地にて培養した菌体を用いた。この実験データのプロットの一例を、Fig. 3-6(B) に示す。それぞれ直線関係が得られ、リノール酸に比べ、パルミチン酸の方が直線の勾配が小さい傾向にあった。このことから、20% エタノール存在下における両者の膜透過性を比較することが可能と考えて、数回の実験データからそれぞれ膜透過係数を算出し、Fig. 3-7 に示す結果を得た。

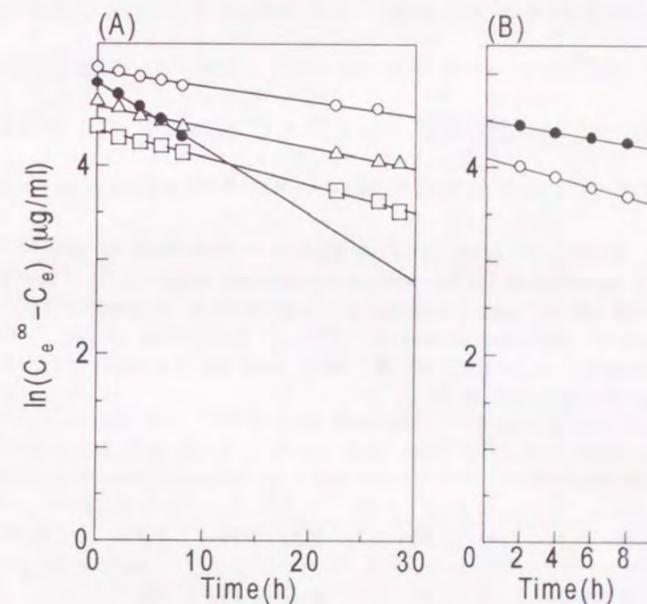


Fig. 3-6. Relationship between  $\ln(C_e^\infty - C_e)$  and time according to Eq. (3-3). (A) The effect of varying ethanol concentration in cell suspension on cell membrane permeability was studied. Ethanol concentration:  $\circ$ , 0%;  $\triangle$ , 10%;  $\square$ , 15%;  $\bullet$ , 20%. (B) Cultures were prepared in basal medium supplemented with 0.5 mM palmitic acid ( $\bullet$ ) or linoleic acid ( $\circ$ ) for the examination of a difference between palmitic acid and linoleic acid with respect to cell membrane permeability. Experimental data were obtained from cell suspension in 20% ethanol.

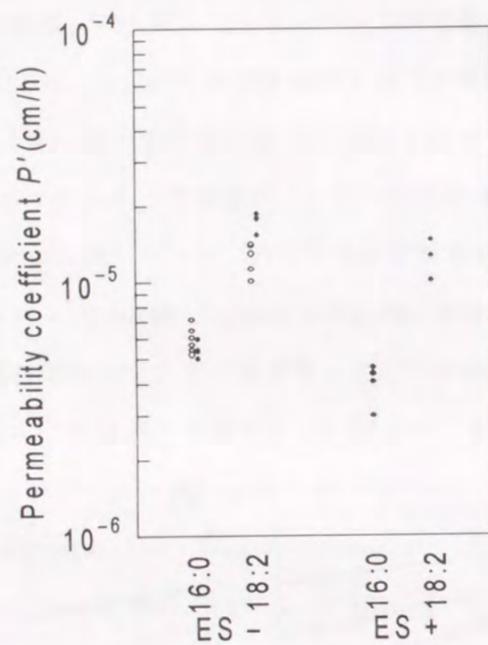


Fig. 3-7. Effect of fatty acid on membrane permeability coefficient ( $P'$ ). Cells cultivated in the medium containing palmitic acid(16:0) or linoleic acid(18:2), supplemented with or without ergosterol(ES), were assigned to the experiments at 15°C, as described in Fig. 3-6B. Defatted albumin(○) or Brij 58(●) were used as the emulsifier for lipids in the cultivation media.

パルミチン酸に富む細胞とリノール酸に富む細胞の膜透過係数の間には、平均値の差の検定によって有意差が認められ、脂肪酸分散剤としてアルブミン、またはBrij58のいずれを用いた場合も、パルミチン酸に富む菌体の方が膜のバリアー能が大きいと考えられた。

Brij58を用いた場合の方が、膜透過係数の差異が顕著に認められたが、Table 3-2に示すように、添加脂肪酸が菌体リン脂質に取り込まれる量が、Brij58の使用によって大きくなったためであると考えられる。さらに1mMエルゴステロールを添加すると、膜透過係数は幾分小さくなる傾向が認められたが、パルミチン酸とリノール酸の添加効果の関係は同様であった。ステロールがリン脂質二重膜の状態によって異なった性質を示すことはよく知られており、相転移点以上の液晶状態ではリン脂質のアシル基とステロールの疎水的相互作用によって流動性が抑制され(43-47)、膜透過性は減少する(48, 49)。リノール酸とともにステロールを添加して培養した菌体では、30°Cにおいて1.0Mエタノールを含む67mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 中で高いエタノール耐性を示すことが報告されており、この実験で用いた15°Cの温度では、膜透過性に及ぼすエルゴステロールの効果が十分に現れなかったと考えられる。嫌気的環境にある清酒醸造では、酵母の脂質中にステロールはほとんど検出されないので(Fig. 1-2)、ステロールの添加効果は考慮しなくてよいと考えられる。

Table 3-2. Fatty acid composition of phospholipids extracted from yeast grown on different fatty acid supplements

Emulsifier	Fatty acid added	PL	Fatty acid composition(%)							$\Delta/\text{mol}$
			14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	
Brij58	16:0	PC	1.6	0.3	54.5	33.3	4.8	5.6	ND	0.39
		PE	1.3	0.2	46.5	43.9	2.3	5.8	ND	0.39
	18:2	PC	8.3	0.1	16.9	1.4	6.7	1.7	63.5	1.30
		PE	5.4	ND	21.4	2.5	3.1	1.1	66.4	1.36
Defatted albumin	16:0	PC	6.6	11.8	34.2	18.4	11.8	17.1	ND	0.47
		PE	4.4	3.3	42.9	23.6	8.8	17.0	ND	0.44
	18:2	PC	4.4	6.9	39.4	15.7	8.8	10.2	14.6	0.62
		PE	4.7	7.7	31.5	17.1	8.7	14.4	15.8	0.71

\* The values of unsaturation( $\Delta/\text{mol}$ ) were calculated as(%monoene+%[diene])/100.

生醗を用いて仕込んだ清酒醗が、穏やかな発酵経過ではあるが、醗末期もよく発酵するという事実がある。これは、リン脂質脂肪酸の不飽和度の小さいことが、高エタノール存在下で大きな膜バリアー能を示すということによって説明できると考えられる。しかしながら、Beavanらは、*S. cerevisiae* NCYC431が脂肪酸を含まない培地でエタノール存在下に増殖するとき、パルミチン酸が減少しオレイン酸が増えて、リン脂質の脂肪酸不飽和度が増大することを報告しており(18)、エタノールに対する適応現象と考えられている。他方、同様の現象は*E. coli*においても見られ、飽和脂肪酸合成の減少によって飽和脂肪酸レベルが下がった結果であり、パルミチン酸を添加することでこの減少がみられなくなることが示されている(19, 20)。したがって、エタノール存在下に増殖した酵母菌体に見られるリン脂質脂肪酸組成変化においても、パルミチン酸の増大することが、高エタノールに対してより耐性をもたらす変化であることを確認しておく必要があり、次項において検討する。

### 3. エタノール存在下での増殖により誘導される酵母細胞ののエタノール耐性

第1章において示したように、増殖培地中のエタノールの有無によって、リン脂質脂肪酸組成は大きく相違しており、エタノール環境下で増殖適応をした結果と考えられる。しかも、培地中に添加された脂肪酸の種類により、その変化は著しく異なり、リノール酸添加によってリン脂質脂肪酸組成中にオレイン酸が増加したが、培地中にパルミチン酸があればパルミチン酸の大きな増大が観察された。いずれの脂肪酸変化によって、高エタノールに対する耐性をもたらされるかを知るために、それぞれ添加脂肪酸とエタノール濃度の異なる培地で生育した菌体を、18%エタノールを含むGYP培地に懸濁し、15°Cにおける生存率の経時変化をみた。結果をFig. 3-8に示す。

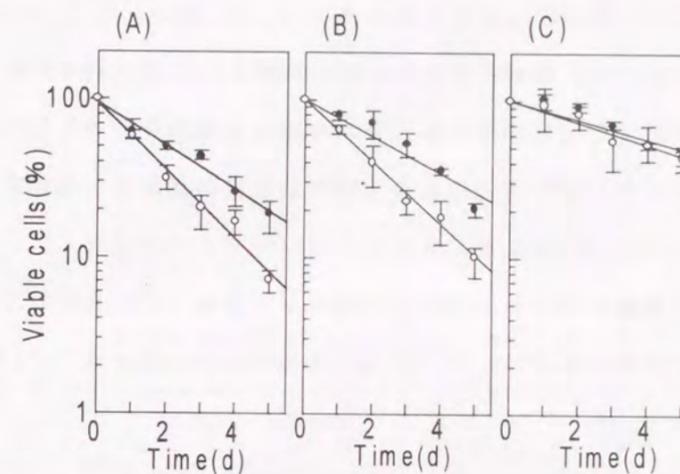


Fig. 3-8. Survival curves for cells of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of 18% ethanol. Cells of *S. cerevisiae* K-7 grown in GYP medium containing 0.5 mM palmitic acid (●) or linoleic acid (○), supplemented with 0% (A), 4% (B), and 8% (C) ethanol respectively, were suspended in GYP medium containing 18% ethanol and incubated at 15°C. The viable cell numbers was measured by spreading dilutions of cells on GYP agr medium. Vertical bars indicate 95% confidence limits for four-fold experiments.

いずれの脂肪酸添加培養菌体においても、増殖培地中のエタノール濃度が大きくなるにしたがい、18%エタノール中における菌体の死滅速度定数は小さくなる傾向が認められた。また、パルミチン酸添加培養菌体の死滅速度定数  $k$  ( $d^{-1}$ ) は、培養時のエタノール濃度が 0, 4, 8% のときそれぞれ 0.328, 0.269, 0.142 となり、リノール酸添加培養菌体のそれはそれぞれ、0.506, 0.453, 0.161 となって、いずれの場合もパルミチン酸添加培養酵母が高い生存率を示した。この事実は、エタノールを含む培地中で増殖した菌体のエタノール耐性の増大を、菌体のリン脂質不飽和脂肪酸の増大の結果として(18)、一義的に説明できないことを示唆している。また、培養時のエタノール濃度が 4% と 8% では菌体のリン脂質脂肪酸組成はほとんど変わらなかったが、8% エタノール存在下に増殖した菌体の死滅速度

定数は急激に小さくなり、8% エタノール中で増殖することによって、脂肪酸組成以外のエタノールに対する耐性機構が誘導されたと考えられる。

#### 4. エタノール存在下に増殖することにより誘導される酵母細胞のバリアー能

菌体を20%エタノールに懸濁したとき、細胞からのヌクレオチド漏出は拡散に従うと考えて、ヌクレオチド漏出量の平衡値と初期の漏出量との差の経時変化を示したものが、Fig. 3-9である。種々の濃度のエタノール存在下に、パルミチン酸またはリノール酸を添加して培養した菌体から得られたいずれのデータも、片対数グラフ上で直線に結ぶことができ、ヌクレオチドの漏出は(3-3)式によって示されることがわかった。

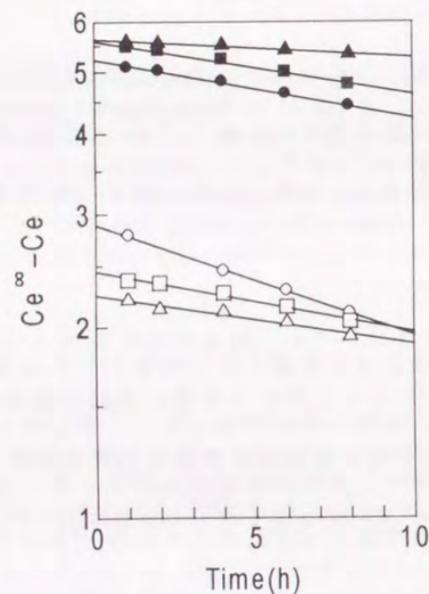


Fig. 3-9. Diffusion of intracellular nucleotide through cell membrane. Cells were suspended in 20% ethanol and incubated at 15°C. Extracellular nucleotide concentration were measured over a time course. Differences between the equilibrium and the measured during the early period were plotted against time. Cultures were prepared in GYP medium containing 0.5 mM palmitic acid (open symbol) or linoleic acid (closed symbol), supplemented with 0% (○, ●), 4% (△, ▲), and 8% (□, ■) respectively.

そこで、直線の傾きと懸濁液中の細胞密度から、膜透過係数  $P'$  を算出し、Table 3-3に示す結果を得た。いずれのエタノール濃度における増殖菌体を比較した場合も、パルミチン酸添加培養酵母の方がリノール酸添加培養酵母に比べて、直線の傾きと懸濁液中の細胞密度から算出した膜透過係数  $P'$  は小さな値を示した。

Table 3-3. Effect of ethanol and fatty acid in growth medium on membrane permeability coefficient  $P'$  of *Saccharomyces cerevisiae*

Culture condition		$P'$ (cm/h)
Ethanol (%)	FFA <sup>a</sup>	
0	16:0	$4.02 \times 10^{-6}$
	18:2	$7.95 \times 10^{-6}$
4	16:0	$3.66 \times 10^{-6}$
	18:2	$4.27 \times 10^{-6}$
8	16:0	$1.19 \times 10^{-6}$
	18:2	$3.47 \times 10^{-6}$

<sup>a</sup> 0.5 mM fatty acid, palmitic acid(16:0) or linoleic acid(18:2) added to the medium.

このように、ヌクレオチド漏出の初期過程を単純拡散に近似して評価できたが、培地中のエタノールの有無によって、漏出量が平衡に達するまでのプロフィールは、Fig. 3-10に示すように、著しく異なった。すなわち、エタノールを含まない培地で培養した菌体からのヌクレオチド漏出は、平衡値に達するまでほぼ一様な拡散に近似することが可能なように見えた。しかしながら、エタノールの存在下に培養された菌体を用いたときには、ヌクレオチドの漏出は、およそ10数時間のあいだ著しく抑制されていた。この傾向は、パルミチン酸、リノール酸のいずれの脂肪酸を添加して培養した菌体にも認められることから、脂肪酸組成に依存しない一過的な膜透過性の低下が、エタノール存在下に培養することによってあらわれたと考えられる。

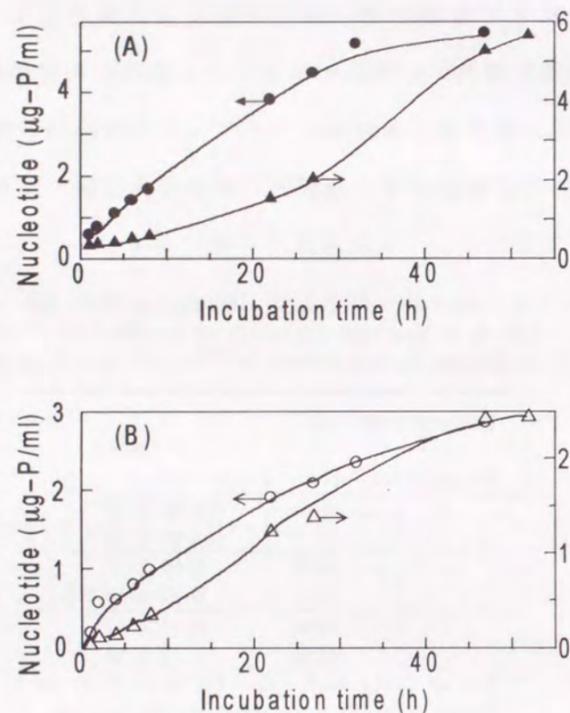


Fig. 3-10. Time course of extracellular nucleotide concentration in cell suspension. Yeast cells incubated in GYP medium containing palmitic acid(A) or linoleic acid(B), in the absence(circle) and presence(triangle) of 8% ethanol were resuspended in 20% ethanol and incubated at 15°C. The cell density in Fig.3-10(A) was  $5.8 \times 10^7$  (●),  $4.9 \times 10^7$  (▲) per ml, and that in Fig.3-10(B) was  $2.7 \times 10^7$  (○),  $7.5 \times 10^6$  (△) per ml respectively.

さらに、初期に認められた漏出量の低下は、Fig. 3-11に示すように、50mMグルコースを添加することによって継続した。このとき、解糖系のグリセルアルデヒド-ホスフェートデヒドロゲナーゼのSH阻害剤モノヨードアセトアミドを添加すると、ほぼ同時にヌクレオチド漏出量が大きくなった。このことから、この漏出の抑制はエネルギー依存的であると考えられ、膜タンパク質が関与していること

を示唆していると考えられる。

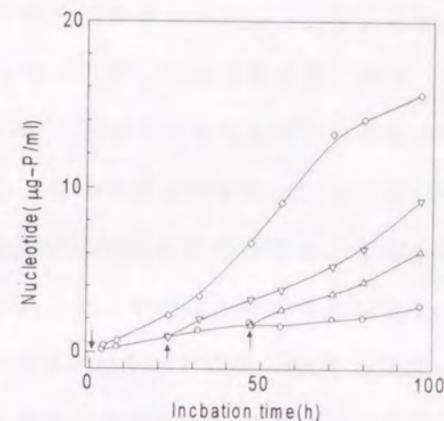


Fig. 3-11. Effect of iodoacetamide on barrier-forming-ability induced by glucose. Cells grown in GYP medium containing 8% ethanol were suspended in 20% ethanol in the presence of 50 mM glucose(○), and 1 mM iodoacetamide was added(Δ, ▽, ◇) at the time when arrows indicated. The concentrations of extracellular nucleotide were measured over the whole time course.

#### 第4節 要約

蛍光色素カルセインを封入したリポソームを、コバルトイオンを含むエタノール緩衝液に懸濁したとき、0~17.5%の範囲でエタノール濃度の増大にともなって、蛍光強度の顕著な減少が認められ、リポソーム膜透過性がエタノール濃度に依存することが示された。17.5%エタノールを含む緩衝液中で、PC-PEリポソーム中に飽和アシル基を持つリン脂質の割合が増大するに従い、蛍光強度の減少速度定数は小さくなった。20%エタノールを含む細胞懸濁液を15°Cにおいたとき、細胞内ヌクレオチドの溶出は(3-3)式で示すことができ、パルミチン酸添加培養菌体は、リノール酸添加培養菌体に比べて小さな膜透過係数 $P'$ を示した。リノール酸添加培養酵母は、パルミチン酸添加培養酵母に比べてエタノール存在下におけ

る生存率が低く、膜透過係数の影響を示唆していた。

エタノール存在下で増殖させることにより、高濃度エタノール中での菌体の膜透過係数 $P'$ は小さくなり、同時に生存率も向上した。しかしながら、この場合にも、パルミチン酸添加培養酵母の方がエタノール耐性、細胞膜バリアー能の、いずれにおいても上回っていた。8%エタノール中で増殖した酵母菌体を用いたとき、高濃度エタノール中で菌体内ヌクレオチドの漏出が初期には抑制され、グルコースを添加することにより漏出量の抑制が持続した。このとき解糖系を阻害するためにモノヨードアセトアミド1mMを添加すると、ヌクレオチドの漏出抑制は消失し、リン脂質膜脂肪酸組成に依存したバリアー能とは別に、エネルギー依存的に膜透過性を抑制する機構が誘導されたことが示唆された。

## 第4章 乳酸菌による蒸し米溶解促進と作用因子の分画

### 第1節 緒言

生醗中のマイクロフローラや、成分の特徴について多くの研究が見られるが、生醗中に存在する種々の微生物の死滅菌体が酵母、または醸造に及ぼす影響についての検討は見あたらない。そこで、死滅菌体が清酒醸造に対して何らかの効果を持つものと予想し、この事を生醗より分離された乳酸菌について検討したところ、麹による蒸米の溶解を促進する現象が見出された。ここでは、この現象を惹起する作用因子の分画、同定を試み、清酒醸造における有効性について検討する。

### 第2節 実験方法

#### 1. 使用菌株

自社生醗より分離した *Lactobacillus sake* L5株を用いた。他に、*L. sake* IFO 3541, *Leuconostoc mesenteroides*として自社生醗より分離したL74, および IFO 3832を用いた。また、*L. casei subsp. ramosans* IFO3863も供試した。

#### 2. 乳酸菌培養条件

GYP培地(酵母エキス0.5%, ポリペプトン1%, グルコース2%)を用い、30℃, 24時間培養した。

#### 3. 菌体消化液の調製

乳酸菌菌体を集菌後、 $2 \times 10^{10}$ /mlになるように無菌水に懸濁し、40℃, 3日間静置した。懸濁液を27,000xg, 10分遠心分離し、上清を自己消化液とした。また、蒸留水に菌体を懸濁後、120℃, 10分オートクレーブし、菌体懸濁液、またはその遠心上清を供試する事も行った。

#### 4. 作用因子の分画

自己消化液を4℃において蒸留水に対し3回透析し、透析内液を得た。3容のエタノールを透析内液に加え、4℃に1晩静置後、遠心分離により沈殿を得、エタノールで洗浄後蒸留水に再溶解し、この遠心上清を粗多糖とした。粗多糖画分に除タンパク質、除核酸のため5%トリクロロ酢酸を加え、4℃において蒸留水に対して透析し、トリクロロ酢酸を除去した。さらに5%酢酸ナトリウムを含む0.5N酢酸中に溶解させ、50mlの溶液に対し0.1gカオリン、0.3gロイド試薬を加えて攪拌し、残存タンパク質を可及的に除去した。この上清に再び3容エタノールを加え、沈殿する画分を多糖画分とした。0.01M硫酸ナトリウムに多糖画分を溶解し、セチルトリメチルアンモニウムブロミドを添加し、37℃、5時間静置後遠心分離により、上清と沈殿をそれぞれ得た。沈殿は1N NaClに溶解後、5容のエタノールを加えて4℃に1晩置き、遠心分離により得られた沈殿を蒸留水に溶解した後、蒸留水に対して透析し、酸性多糖画分とした。他方、上清は7容のエタノールを加え、4℃に1晩静置後、遠心分離により得られた沈殿をエタノール、ジエチルエーテルで洗浄し、蒸留水に溶解して中性多糖画分とした。

#### 5. 化学分析

消化液の分画を以下の方法により分析した。リンの定量は過ヨード酸法(31)により行い、ヘキソサミンの定量は、Sakuraiらの方法(50)にしたがい、試料を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中で120℃、1時間加水分解し中和後、Blix法により行った。ヘキソースはAnthrone法により定量し、同定は試料を0.75N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中で100℃、3時間加水分解し、炭酸バリウムにより硫酸を除去後、1%アンモニア-フェノール(1:4)を展開溶媒とするペーパークロマトグラフィーによりアニリン試薬を発色剤として行った。グリセロールは、同加水分解液を試料としてFキット・グリセロール(ペーリンガー・マンハイム山之内)を用いた酵素法により検出した。アミノ酸は、6N HClによりN<sub>2</sub>ガス中で加水分解し、アミノ酸アナライザーML203(アトー製)により測

定した。

#### 6. 細胞壁の調製

Cummins, Harrisの方法(51)により、乳酸菌菌体より細胞壁を調製した。すなわち、菌体のホモジュネートから遠心により粗細胞壁を集め、熱処理後、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.6)中で37℃においてトリプシン、RNase処理を3時間行い、洗浄後0.02N HCl中でペプシン処理を24時間行った。水で数回洗浄して得られた精製細胞壁標品を蒸留水に懸濁し、120℃、10分オートクレーブを行い、遠心分離によって得られる上清を可溶化細胞壁を含む試料とした。

#### 7. テイコ酸の調製

Armstrongらの方法(52)に従って、細胞壁よりテイコ酸を抽出した。すなわち、精製細胞壁を10%トリクロロ酢酸に懸濁し、4℃に1晩攪拌抽出後、遠心によって上清を分離した。上清に3容のエタノールを加え4℃に1晩静置し、沈澱を遠心によって分離し、エタノールで数回洗浄したものをテイコ酸とした。

#### 8. モデル酒母中での消化実験

グルコース2%(W/V)およびエタノール0, 5, 10, 15%(W/V)を含む100mM乳酸緩衝液(pH3.85)に乳酸菌L5株の洗浄菌体を $2 \times 10^9$ /mlになるように懸濁し、10℃または20℃に静置した。経時的に遠心上清を採取し、4℃において蒸留水に対して4回透析後、リンの定量と、260nmにおける吸光度の測定を行った。OD<sub>260</sub> = 0.286(光路長1cm)を全核酸10μg/mlとみなして、全リンから核酸態リンをさしひき、テイコ酸由来のリンとした。

#### 9. α化米溶解試験

α化米16g、凍結保存麴10gに対し、菌体消化液またはその分画液を含む20mM乳酸緩衝液(pH4.0)40mlの組成比からなる仕込を行い、15℃または12.5℃において溶解試験を行った。また乳酸緩衝液にかえて井水を用い、55℃での溶解試験も行った。

### 10. 清酒小仕込試験

Table 4-1に示す仕込配合で、清酒小仕込試験を行った。添仕込、仲仕込、留仕込のいずれかの際に、 $5.6 \times 10^{10}$ 細胞の乳酸菌L5株より抽出したテイコ酸(リン含量 $150 \mu\text{g}$ )を添加し、添仕込温度を $15^\circ\text{C}$ 、仲仕込および留仕込温度を $10^\circ\text{C}$ とし、以降毎日1度ずつ $15^\circ\text{C}$ まで昇温させた。

Table 4-1. Feed program for preparation of sake mashes.

Material	1st (hatsuzoe)	2nd (nakazoe)	3rd (tomezoe)	Total
$\alpha$ -rice(g)	24	43	87	154
Rice-koji(g)	13	12	23	48
Well water(ml)	62	77	170	309

### 11. 溶解率の算出

$\alpha$ 化米溶解試験、および清酒小仕込試験の醪を経時的に遠心分離して、その上清をニトロセルロース製メンブランフィルター(ポアサイズ $0.45 \mu$ )でろ過後、密度比重計DA-210(京都電子工業)で測定した。清酒小仕込試験のろ液は国税庁所定分析法注解に従い蒸留後、留液のアルコール度を密度比重計で測定した。ろ液の比重とアルコール度から永谷の方法によって(53)基質溶解率を求めた。この際に水分については $\alpha$ 化米11%、麴22%、溶解基質については $\alpha$ 化米83%、麴69%として算出した。ここに言う基質とは、 $\alpha$ 化米および麴中の全固形物のうち麴菌の酵素によって溶解可能な成分を指す。

## 第3節 実験結果

### 1. $\alpha$ 化米溶解に及ぼす死滅菌体懸濁液の効果

乳酸菌L5株の懸濁液をオートクレーブ処理後、種々の菌体密度になるよう汲水

に加え、 $15^\circ\text{C}$ において $\alpha$ 化米溶解試験を行い、溶解率を経時的に求めた。汲み水中の乳酸菌数と基質溶解率との関係を Fig. 4-1に示す。これから、死滅菌体添加による $\alpha$ 化米の溶解率の増大は溶解の初期に顕著に認められ、菌体密度約 $6 \times 10^8/\text{ml}$ までは菌体密度にほぼ比例した。このことから、L5株菌体成分中に $\alpha$ 化米の溶解を促進する作用物質の存在が示唆された。

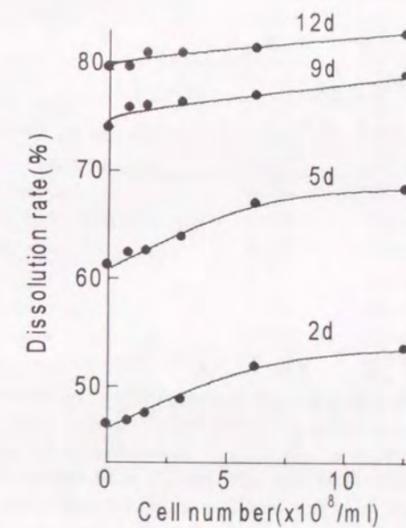


Fig. 4-1. Relation between cell number of lactic acid bacteria and dissolution rate of substrate. 40 ml of 20 mM lactate buffer(pH 4.0), including autoclaved cell suspension, was added to 16 g of  $\alpha$ -rice and 10 g of frozen rice koji. Saccharification was carried out at  $15^\circ\text{C}$  for 2 to 12 days.

### 2. 種々の菌株による溶解促進作用

*L. sake* 2株, *Leuc. mesenteroides* 2株, *L. casei subsp. rhamnosans* 1株につき、菌体懸濁液をオートクレーブ処理後、その遠心上清の透析内液を汲水の一部とし、 $55^\circ\text{C}$ で $\alpha$ 化米溶解試験を行った。いずれの菌株を用いた場合も溶解率の増大が認められ、菌体の違いによらず汲み水中のヘキソース濃度と溶解率の間に

は有意な相関が認められた (Fig. 4-2). このことから, 溶解促進因子は多糖類である可能性が示唆され, 乳酸菌に共通の菌体成分に由来しているものと推察された.

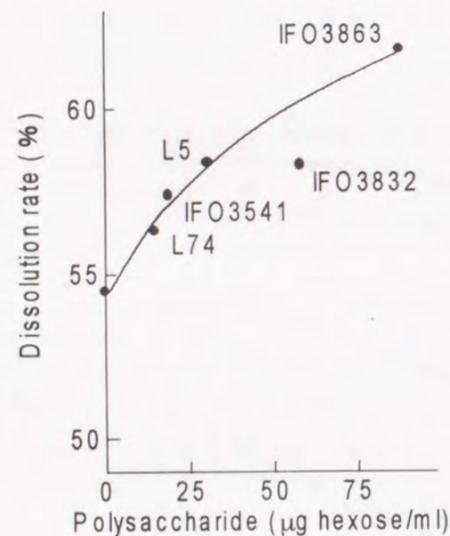


Fig. 4-2. Effect of polysaccharide from various lactic acid bacteria on dissolution of  $\alpha$ -rice. 4 g of  $\alpha$ -rice and 2.4 g of frozen rice koji were added to 10 ml of 10 mM lactate buffer (pH 4.0), including 10% of dialyzed solution, and incubated at 55°C for 5 hours. Dialyzed solution was prepared from the supernatant of the autoclaved cell suspension as the polysaccharide fraction. The organisms employed were *Leuconostoc mesenteroides* L74 and IFO3832, *Lactobacillus sake* L5 and IFO3541, *L. casei* subsp. *rhamnosans* IFO 3863.

### 3. 分画液の溶解に及ぼす添加効果

結果をTable 4-2に示す. 乳酸菌L5株の自己消化液, その透析内液, さらにオートクレーブ処理を行ったものについて, これを汲水の一部として55°Cにおいて $\alpha$ 化米溶解試験を行った. 溶解率は対照が79.7%であったのに対し, いずれの場合もほぼ87%と同様の値を示した. このことから, 溶解促進物質は自己消化によ

て溶出する熱に安定な高分子物質であると考えられた.

さらに溶解率の増大は, 多糖画分でも同程度に認められ, その効果のほとんどが酸性多糖画分の添加により引き起こされるものと考えられた.

Table 4-2. Effect of subcellular fraction on dissolution of  $\alpha$ -rice.

Addition	Baume	Dissolution ratio (%)	Hexose content ( $\mu$ g/ml)
Control	15.39	79.7	
Autolyzate	16.55	87.1	54.5
Autoclaved autolyzate	16.55	87.1	54.5
Dialyzed solution	16.57	87.3	47.9
Control	13.76	69.6	
Dialyzed solution	15.42	79.9	172
Crude polysaccharide	15.17	78.3	166
Control	12.20	60.4	
Polysaccharide	13.31	66.9	30
Acidic fraction	13.14	65.9	13
Neutral fraction	12.45	61.8	14

40 ml of well water, including the fraction, was added to 16 g of  $\alpha$ -rice and 10 g of frozen rice-koji. Saccharification was carried out at 55°C for several hours.

### 4. 分画成分の化学分析

粗多糖, および酸性多糖画分の分析結果をTable 4-3に示す. 粗多糖からは, リン酸, ヘキソース, グリセロール, ヘキソサミン, アミノ酸としてアラニン, リジン, グルタミン酸, アスパラギン酸が定量された. これらの組成から, 粗多糖画分には, 消化により可溶化した細胞壁が含まれているものと考えられる. 他方, 酸性多糖については, アミノ酸としてアラニンのみが検出され, ヘキソースについてはペーパークロマトグラフィーによってグルコースのスポットのみが認められた. これらから, 酸性多糖画分はテイコ酸よりなると考えられる.

Table 4-3. Chemical analysis of polysaccharide fractions.

	Crude polysaccharide ( $\mu\text{g}$ in approx. 8mg)	Acidic polysaccharide ( $\mu\text{g}$ in 2.81mg)
Total $\text{PO}_4$	630.4	629.0
Hexose(as glucose)	1471.2	683.5
Glycerol	+(1414.4)*	+(591.0)*
Hexosamine(as glucosamine)	200.0	80.5
Alanine	577.6	81.9
Lysine	150.4	0
Glutamic acid	152.0	0
Aspartic acid	92.8	0

\* Glycerol was regarded as equivalent to  $\text{PO}_4$  in molar concentration; the estimates are given in parentheses.

#### 5. 可溶化細胞壁の添加効果

溶解促進因子が細胞壁に由来することを確認するために、L5株より調製した精製細胞壁を蒸留水に懸濁し、オートクレーブ後、その遠心上清を汲水の一部として $\alpha$ 化米溶解試験を $12.5^\circ\text{C}$ において行った。細胞壁溶出成分中のリン濃度と溶解率の関係をFig. 4-3に示す。細胞壁から可溶化してくる物質により溶解率は向上しており、行った添加量の範囲で溶出成分中のリン濃度にほぼ比例して値は大きくなった。

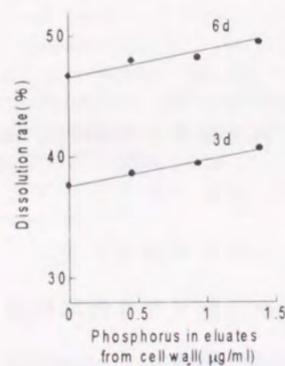


Fig. 4-3. Relation between phosphorus in cell wall fraction and dissolution rate. 20 ml of 20 mM lactate buffer(pH 4.0), including various amounts of soluble cell wall fraction, was added to 8 g of  $\alpha$ -rice and 5 g of frozen rice-koji. The soluble cell fraction was prepared by dialysis of the supernatant of the autoclaved cell wall suspension. Saccharification was carried out at  $12.5^\circ\text{C}$ .

#### 6. テイコ酸の添加効果

溶解促進因子が細胞壁中のテイコ酸であることを確認するために、精製細胞壁から抽出されたテイコ酸を汲水に加えて、 $12.5^\circ\text{C}$ において $\alpha$ 化米溶解試験を行った。結果をFig. 4-4に示す。

テイコ酸の添加量に応じ溶解率は増大し、その傾向は溶解初期ほど顕著に認められた。テイコ酸抽出に用いた菌体のレベルでみると、ほぼ $6 \times 10^8/\text{ml}$ に相当する範囲まではテイコ酸添加量に比例した溶解率の増大があり、Fig. 4-1に示した傾向によく一致した。

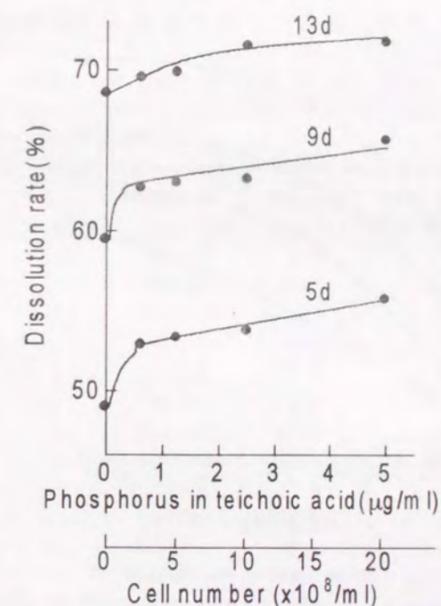


Fig. 4-4. Relation between the concentration of teichoic acid and dissolution rate. Saccharification was carried out at  $12.5^\circ\text{C}$  using the same method as described in Fig. 4-3.

### 7. モデル酒母中でのテイコ酸の溶出

モデル酒母中でのテイコ酸由来と考えられるリンの経時変化をFig. 4-5に示す。10℃において種々のエタノール濃度において検討したところ、濃度の上昇にともない、テイコ酸の溶出速度は増大するものと考えられた。また、酒母において湧き付き休み期間に相当する環境と考えられる20℃、エタノール濃度10%(V/V)においては、ほぼ4日で $4.51 \mu\text{g-P}/2 \times 10^9$  cellsと最大溶出量に達し、同菌から抽出により得られたテイコ酸量 $4.63 \mu\text{g-P}/2 \times 10^9$  cellsの97%にあたる値を示した。4日後の上清の透析内液を汲水の一部として、12.5℃において5日間 $\alpha$ 化米溶解試験を行ったところ、Fig. 4-6に示す結果が得られ、テイコ酸濃度と溶解率の間に、同菌から抽出したテイコ酸を添加した際とほぼ同様の関係が認められた。

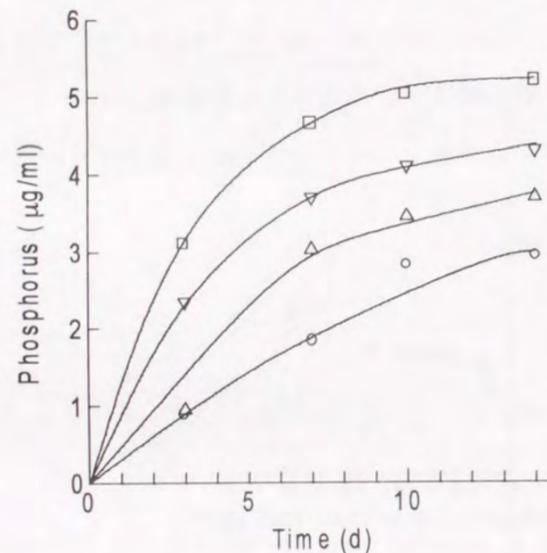


Fig. 4-5. Effect of ethanol concentration on elution of teichoic acid fraction in a model *moto*. *L. sake* L5 was suspended in 100 mM lactate buffer (pH 3.85) including 0% (○), 5% (△), 10% (▽), or 15% (□) ethanol, supplemented with 2% (w/v) glucose. The suspension was incubated at 10°C. Teichoic acid was incubated as the difference between total P and nucleic acid-form P in dialyzed solution of the supernatant after centrifugation.

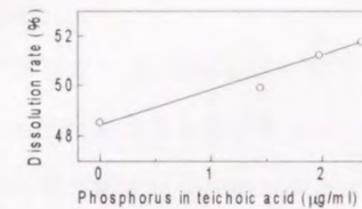


Fig. 4-6. Effect of teichoic acid dissolved in a model *moto* on dissolution of  $\alpha$ -rice. A model *moto* including 10% (v/v) of ethanol was allowed to stand for 4 days at 20°C. 20 ml of 20 mM lactate buffer (pH 4.0), including various amounts of dialyzed solution of the supernatant, was added to 8 g of  $\alpha$ -rice and 10 g of frozen rice-*koji*. The dissolution rate was measured after 5 days at 12.5°C.

### 8. 清酒小仕込試験における効果の確認

清酒小仕込試験において、テイコ酸の添加を添仕込み、仲仕込、または、留仕込に行った際の成分の経時変化をTable 4-4に示す。テイコ酸の添加時期が早いほど、溶解率は醪初期から顕著に増大し、醪末期まで認められた。

Table 4-4. Effect of teichoic acid on the change of ethanol concentration, specific gravity, and dissolution rate (%) during fermentation of laboratory-scale mashes.

Fermentation time*	Phase of addition	Ethanol (%v/v)	Sake meter	Dissolution rate (%)
5	Control	2.8	-57.3	43.1
	<i>Tomezoe</i>	3.3	-54.8	44.1
	<i>Nakazoe</i>	3.3	-57.1	45.1
	<i>Hatsuzoe</i>	3.7	-57.0	46.9
9	Control	12.5	-25.9	74.7
	<i>Tomezoe</i>	12.9	-27.8	77.9
	<i>Nakazoe</i>	12.4	-29.8	76.5
	<i>Hatsuzoe</i>	13.0	-27.6	78.7
11	Control	17.8	-2.1	91.8
	<i>Tomezoe</i>	17.9	-2.5	92.2
	<i>Nakazoe</i>	18.1	-2.8	93.6
	<i>Hatsuzoe</i>	18.0	-3.4	93.4

Teichoic acid (phosphorus content  $150 \mu\text{g}$ ), extracted from approximately  $5.6 \times 10^{10}$  cells, was added to the fed water for preparation of sake mash.

The specific gravities of the supernatants and the distillates from the supernatants were measured by a density/specific gravity meter, and their values were converted to the sake meter and the concentration of ethanol. The dissolution rate was calculated according to the method of Nagatani *et al.*

\* Days after the last feed (*tomezoe*).

#### 第4節 考察

生醗においてマイクロフローラに関する多くの研究があるにも関わらず、これらの菌体の死滅消化後の酵母あるいは醸造への影響についての報告はなかった。本章において、乳酸菌を材料に蒸米溶解促進効果が示され、死滅菌体成分の影響について今後さらに検討する余地のあることが示唆された。

蒸米溶解促進作用はテイコ酸によると考えられ、数種の乳酸菌においてその効果が確認された。したがって、この効果はグラム陽性細菌について一般に期待されるものと考えられる。しかしながら、米と米麹からなる系での溶解試験でのみ検討しているので、今後他の系で同様な効果が現れるかどうかを見ることは、その作用機作を推察する上でさらに有用な手がかりになると考えられる。乳酸菌桿菌の自己融解活性がプロトプラスト形成に関与することや(54)、自己消化にともない細胞壁成分の溶出することがすでに知られている(55)、モデル酒母中の消化実験において、テイコ酸の溶出はエタノール濃度に大きく影響されたが(Fig. 4-5)、透析内液の糖含量はいずれの場合もほぼ同様の経過を示した(データ省略)。このことから、細胞壁の消化にともない、その組成を保った高分子化合物が溶出するのではなく、エタノールの存在によりテイコ酸画分の溶出が促進されるものと考えられる。

清酒小仕込試験におけるテイコ酸の添加量は、酒母を用いる標準的な仕込配合において、酒母中に乳酸菌 $1.6 \times 10^9$ /g由来のテイコ酸が存在すると考えた場合の値に相当し、実際的な量と考えられる。テイコ酸の添加を添仕込の際に行った場合に最も溶解率が増大したことから、溶解促進効果は段仕込において継続的に現れていると考えられる。したがって、蒸米溶解促進のためには、テイコ酸の溶出が枯らし中に完了していることが望ましい。酒母の湧付き休みは22~24℃において2~3日間進められるが、エタノール濃度10%のモデル酒母において20℃、4日

おおむねテイコ酸が最大溶

出量に達することから、温み取り(酒母の品温を30℃近辺まで昇温する操作)後までに大部分の溶出があるものと考えられる。

テイコ酸のような高分子電解質が蒸米溶解を促進する機作については、次章で検討する。

#### 第4節 要約

生醗より分離した乳酸菌 *Lactobacillus sake* L5株を自己消化に供したところ、自己消化液は、麹による $\alpha$ 米の溶解を促進することがわかった。実験に供した数種の乳酸菌のいずれについても溶解促進作用が見られた。溶解促進活性は、消化液中の酸性多糖画分にあり、この画分は成分組成からテイコ酸と考えられ、さらに精製細胞壁から調製したテイコ酸を添加することにより、 $\alpha$ 米溶解が促進された。*L. sake* L5を100mM乳酸緩衝液(pH3.85, 2%グルコースを含む)に懸濁したとき、テイコ酸の溶出は温度とエタノール濃度の影響を受け、10%エタノール存在下に20℃、4日間おいたとき、ほとんどのテイコ酸が溶出した。酒母中の乳酸菌に対応する抽出テイコ酸を仕込み水に添加した清酒小仕込み試験において、溶解促進による基質溶解率の向上が認められた。また、段仕込みの初期に添加するほどその効果は大きかった。

第1節 緒言

前章において、乳酸菌から自己消化により溶出するテイコ酸が $\alpha$ 化米の溶解を促進し、生胚を使用した際にその効果が期待されることを述べた。本章では、高分子電解質であるテイコ酸が、どのような作用機作で $\alpha$ 化米の溶解を促進しているのかについて検討した。

清酒醸造においては、蒸米の溶解に阻害的に働く高分子として、米タンパク質オリゼニンがあり(56)、黄麹菌由来の $\alpha$ -アミラーゼと静電的に吸着することがその原因であることが明らかにされている(57)。ここでは、黄麹菌由来 $\alpha$ -アミラーゼの、オリゼニンへの吸着に及ぼすテイコ酸の影響と、 $\alpha$ 化米の溶解の関係について検討した。

第2節 実験方法

1. 酵素

*Aspergillus oryzae* 起源の結晶アミラーゼ(三共製: KAAと略称する)、*Bacillus subtilis* 起源の $\alpha$ -アミラーゼ(和光純薬製: BAAと略称する)および*Aspergillus oryzae* 起源のジアスターゼ(東京化成工業製)を用いた。

2. イオン交換樹脂

アンバーライトIRA401(強塩基性陰イオン交換樹脂)およびアンバーライトIR120B(強酸性陽イオン交換樹脂)を使用した。

3. タンパク質

米タンパク質として平成1年度産の日本晴(精米歩合70%)から、石川、布川の方

法(58)に従って分画したオリゼニン画分(オリゼニンと略称する)を用いた。その他のタンパク質は、仔牛胸腺のヒストン(シグマ製)および絹フィブロイン(和光純薬製)を用いた。

4. テイコ酸

Cummins, Harrisらの方法(51)により得られた*Lactobacillus sake* L5株の精製細胞壁から、Armstrongらの方法(52)に従ってテイコ酸を調製した。また第4章で用いた方法に従い、乳酸菌自己消化液を調製し、それより得られるテイコ酸画分も用いた。

5.  $\alpha$ -アミラーゼ、およびテイコ酸の米粉またはオリゼニンへの吸着

$\alpha$ -アミラーゼの、生米粉またはオリゼニンへの吸着におよぼすテイコ酸の影響を検討するため、生米粉(100~200メッシュ)、またはオリゼニンを吸着体として、これに実験ごとに一定量の $\alpha$ -アミラーゼおよび種々の濃度のテイコ酸を含む各種緩衝液を加え、十分に攪拌した後、4℃にて1晩放置し、 $\alpha$ -アミラーゼおよびテイコ酸を吸着させた。懸濁液は攪拌した後遠心分離(1,700 x g, 10分)して、得られた上清の $\alpha$ -アミラーゼ力価、およびリン濃度の測定から、 $\alpha$ -アミラーゼおよびテイコ酸の吸着量(率)を算出した。

6. 不溶性タンパク質への吸着

不溶性のフィブロイン100mg、ヒストン10mg に対して、22.4unitsのKAAを含んだpH4.0、20mM乳酸緩衝液2mlを加えて攪拌し、4℃で一晩吸着させた。この際に、テイコ酸画分(リン含量にして15.9 $\mu$ g)を含む緩衝液も用い、 $\alpha$ -アミラーゼ吸着率は、添加した $\alpha$ -アミラーゼと上清の $\alpha$ -アミラーゼ力価の差を吸着量として、添加した $\alpha$ -アミラーゼに対する百分率で示した。

7. イオン交換樹脂による吸着

再生した樹脂を、pH4.2、20ml酢酸緩衝液で平衡化した後、水分を可及的に除いた樹脂100mgに364unitsのKAAを含んだ酢酸緩衝液2mlを加え、4℃で1晩吸着さ

せた。この際に、さらにテイコ酸画分(リン含量にして39.7 $\mu$ g)を含む酢酸緩衝液も用い、遠心上清の $\alpha$ -アミラーゼ力価とリンの測定を行った。

#### 8. 分析法

$\alpha$ -アミラーゼの力価は国税庁所定分析法注解(59)に従って測定し、1%可溶性デンプンを基質として、40 $^{\circ}$ C、30分間反応を行ったときのWohlgemuth価で示した。リンは過ヨード酸法(31)により、タンパク質はLowryらの方法によって測定した。

### 第3節 実験結果

#### 1. $\alpha$ 化米溶解試験における基質残存率の経時変化

$\alpha$ 化米16g、凍結麹10gに対して、20mM乳酸緩衝液(pH4.0)40mlを加え、12.5 $^{\circ}$ Cにおいて溶解試験を行った。この条件下におけるテイコ酸(リン含量にして200 $\mu$ g)添加が溶解率の経時変化に及ぼす影響をFig. 5-1に示す。初期に麹中の基質が非酵素的に急速に溶解することによると考えられる残存基質の低下(60)があったが、測定範囲内では一定の溶解速度を示し、溶解速度を表す直線の勾配は、テイコ酸を添加した際にもほぼ同じであった。このことから測定範囲内では溶解速度にほとんど差はなく、溶解量の違いは溶解初期に現れていると考えられた。

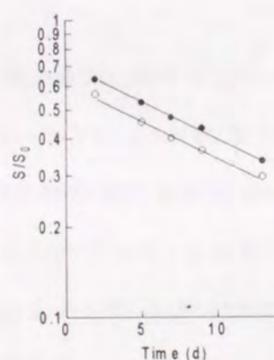


Fig. 5-1. Effect of teichoic acid on changes in the content of residual substrate(S/S<sub>0</sub>). 40 ml of 20 mM lactate buffer(pH 4.0) was added to 16 g of  $\alpha$ -rice and 10 g of frozen rice koji. Saccharization was carried out at 12.5 $^{\circ}$ C. Symbols: ●, teichoic acid; ○, not added.

#### 2. 米溶解試験における液中 $\alpha$ -アミラーゼ活性

3980 unitsのジアスターゼ、および乳酸菌自己消化液または透析内液10%を含む20mMコハク酸緩衝液(pH4.4)25mlに、 $\alpha$ 化米10gを加え、15 $^{\circ}$ Cに24時間溶解後、 $\alpha$ -アミラーゼ吸着量(率)を調べた。対照が2446 unitsの吸着量を示したのに対し、自己消化液または透析内液を添加すると、それぞれ1146 units(47%)、1403 units(57%)と低減した。

#### 3. 起源の異なる $\alpha$ -アミラーゼによる溶解

4480 unitsのKAAまたはBAAを含む20mM乳酸緩衝液(pH4.0)16mlに、 $\alpha$ 化米10gを加え、15 $^{\circ}$ Cにおいて2週間溶解を行った。結果をTable 5-1に示す。BAA添加では、テイコ酸画分の添加の有無に関わらず同じ溶解率を示したが、KAA添加では、テイコ酸画分の添加により溶解率が54.2%から60.5%に増大した。

Table 5-1. Effect of teichoic acid on enzymatic dissolution of  $\alpha$ -rice

Enzyme source	Teichoic acid	Baume	Dissolution rate (%)
<i>Asp. oryzae</i>	-	11.46	54.2
	+	12.50	60.5
<i>B. subtilis</i>	-	13.13	64.4
	+	13.12	64.3

16 ml of 20 mM lactate buffer(pH 4.0) containing  $\alpha$ -amylase(280 units/ml) and teichoic acid fraction(hexose content 13.7  $\mu$ g/ml), was added to 10 g of  $\alpha$ -rice and allowed to stand at 15 $^{\circ}$ C for 2 weeks.

#### 4. $\alpha$ -アミラーゼの吸着に及ぼすテイコ酸量の影響

黄麹菌の $\alpha$ -アミラーゼが蒸米に吸着することは知られているが(61), ここでは40mgの米粉(日本晴, 平成1年産)に $\alpha$ -アミラーゼ317 unitsを含む20mM乳酸緩衝液を加え, 吸着率に及ぼすテイコ酸濃度の影響を調べた. 結果は, Fig. 5-2に示すように, テイコ酸添加量と吸着量の対数の間には直線関係が認められた.

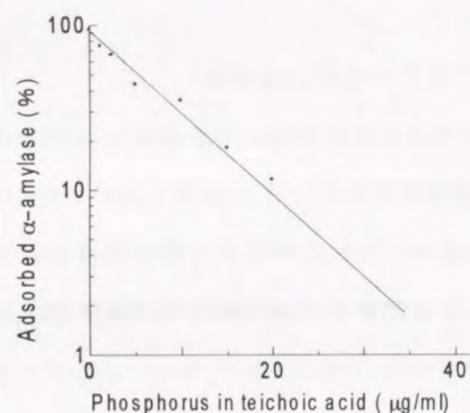


Fig. 5-2. Effect of teichoic acid on  $\alpha$ -amylase adsorption onto rice. To 40 mg of rice powder, 1 ml of 20 mM lactate buffer (pH 4.0) containing 317 units of  $\alpha$ -amylase and various amounts of teichoic acid (phosphorus content 0.5~39.7  $\mu$ g) was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 4°C.  $\alpha$ -amylase activity in the supernatant was measured.

#### 5. オリゼニンへのテイコ酸の吸着

不溶性のオリゼニン5mgに対し, KAA357 unitsまたはテイコ酸画分(リン含量29.3  $\mu$ g)を含む20mM乳酸緩衝液(pH4.0)1mlを加えた際の,  $\alpha$ -アミラーゼとテイコ酸の吸着量をTable 5-2に示す. テイコ酸画分を含まない場合には $\alpha$ -アミラーゼはほぼ100%吸着されたが, テイコ酸が存在すると吸着率は12%と著しく低下した. 他方, テイコ酸は $\alpha$ -アミラーゼの有無に関わらずほぼ100%が吸着された.

Table 5-2. Adsorption of  $\alpha$ -amylase and teichoic acid onto oryzenin.

$\alpha$ -Amylase	Teichoic acid	Adsorbed $\alpha$ -amylase (U)	Adsorbed teichoic acid ( $\mu$ g-P)
+	-	371 (99%)	n. t. *
-	+	n. t. *	29.2 (100%)
+	+	45 (12%)	29.3 (100%)

To 5 mg of oryzenin, 1 ml of 20 mM lactate buffer (pH 4.0) containing 375 units of  $\alpha$ -amylase and teichoic acid fraction (29.3  $\mu$ g-P) was added, and each suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 4°C. The suspension was centrifuged (1,700 x g, 10 min).  $\alpha$ -Amylase and phosphorus in the supernatant were measured.

\* Not tested.

つぎにオリゼニンのテイコ酸吸着量を種々の量のテイコ酸を含んだpH4.5, 20 mM乳酸緩衝液を用いて検討した. 結果は, Fig. 5-3に示したように, 添加テイコ酸中のリン含量が約10  $\mu$ g/mg-オリゼニン まではほぼ添加量の90%が吸着された.

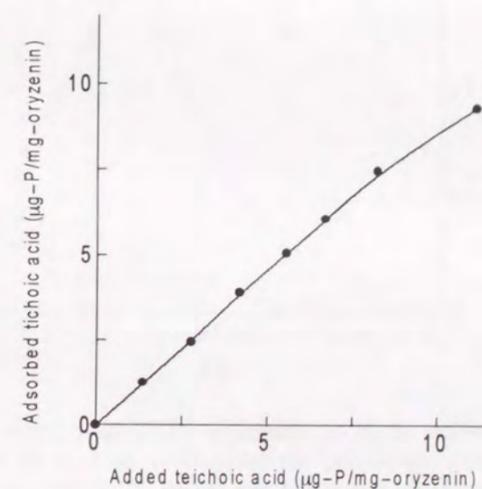


Fig. 5-3. Adsorption profile of teichoic acid onto oryzenin. To 1 mg of oryzenin, 0.5 ml of 20 mM lactate buffer (pH 4.5) containing various amounts of teichoic acid was added, and each suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. The suspension was centrifuged (1,700 x g, 10 min) and the phosphorus content in the supernatant was measured.

## 6. pHの影響

$\alpha$ -アミラーゼ、およびテイコ酸の吸着に及ぼすpHの影響の違いを、オリゼニン(タンパク質として2mg)に対してKAA604 unitsまたは、テイコ酸(リン含量にして15.3  $\mu$ g)を含んだ10mMの乳酸緩衝液を用いて調べた。結果はFig. 5-4に示すように、 $\alpha$ -アミラーゼについては椎木ら(56)と同様の結果が得られ、pH4付近でもっとも吸着し、pH3またはpH6ではあまり吸着しなかった。他方、テイコ酸については、pH3でもっとも吸着し、pHの上昇とともに漸減し、pH5では25%まで低下した。

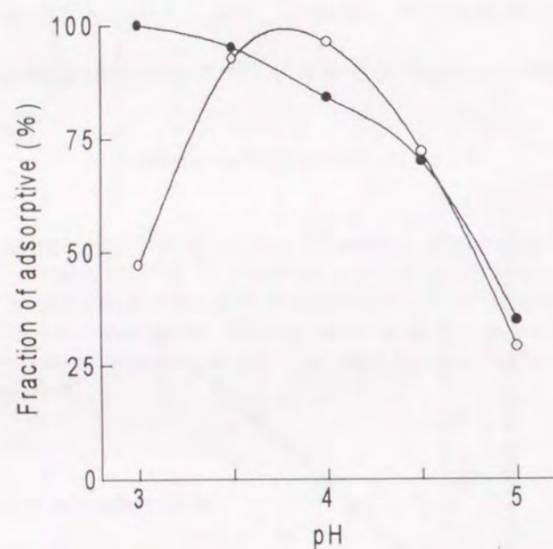


Fig. 5-4. Effect of pH on adsorption. To 2 mg of oryzenin, 1 ml of lactate buffer containing 604 units of  $\alpha$ -amylase or teichoic acid (phosphorus content 15.5  $\mu$ g) was added. The supernatant was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 4°C.  $\alpha$ -Amylase activity and phosphorus in the supernatant were measured. Symbols: ●, teichoic acid; ○,  $\alpha$ -amylase.

## 7. 酸濃度の影響

蒸米や白米の $\alpha$ -アミラーゼ吸着能は、有機酸の種類、酸濃度に左右されることが知られている(57)。オリゼニンのテイコ酸吸着に及ぼす有機酸濃度の影響を、オリゼニン(タンパク質として2mg)を用いて、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と比較検討した。KAA 584unitsまたはテイコ酸(リン含量にして15.1  $\mu$ g)を含んだpH4.5乳酸緩衝液を調製して得られた結果をFig. 5-5に示す。乳酸緩衝液濃度の増大にともなう吸着率の低下は、 $\alpha$ -アミラーゼに比べてテイコ酸の場合には緩やかであり、100mMにおいて $\alpha$ -アミラーゼはほとんど吸着されないのに対して、テイコ酸は63%の吸着率を示した。また、クエン酸緩衝液を用いた場合 $\alpha$ -アミラーゼの吸着率が10mMにおいても低いと報告されているが(56)、クエン酸緩衝液についても行ったところ、テイコ酸は $\alpha$ -アミラーゼに比べて高い吸着率を示した(データ省略)。

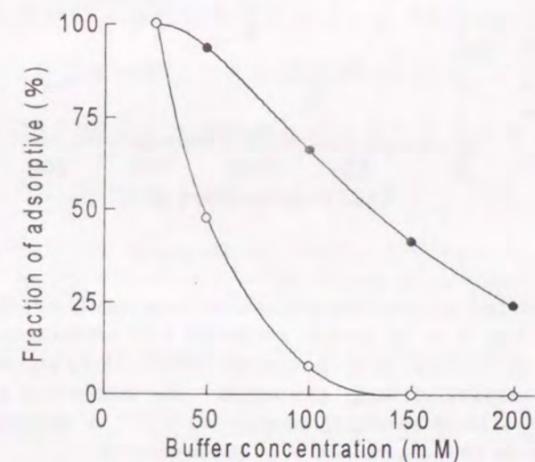


Fig. 5-5. Effect of buffer concentration on adsorption. To 2 mg of oryzenin fraction, 1 ml of lactate buffer (pH 4.5) containing 584 units of  $\alpha$ -amylase or teichoic acid (phosphorus content 15  $\mu$ g) was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 4°C.  $\alpha$ -Amylase activity and phosphorus in the supernatant were measured. Symbols: ●, teichoic acid; ○,  $\alpha$ -amylase.

## 8. 塩濃度の影響

オリゼニンのテイコ酸吸着に及ぼす塩濃度の影響について、 $\alpha$ -アミラーゼ吸着と比較するために、種々の濃度の食塩を含んだpH4.5, 20mM乳酸緩衝液を用いて検討した。結果はFig. 5-6に示すように、食塩濃度の増加に伴うテイコ酸の吸着率の低下は、 $\alpha$ -アミラーゼの場合に比べて穏やかで、 $\alpha$ -アミラーゼが食塩濃度100mMで吸着されないのに対し、テイコ酸は28%が吸着された。

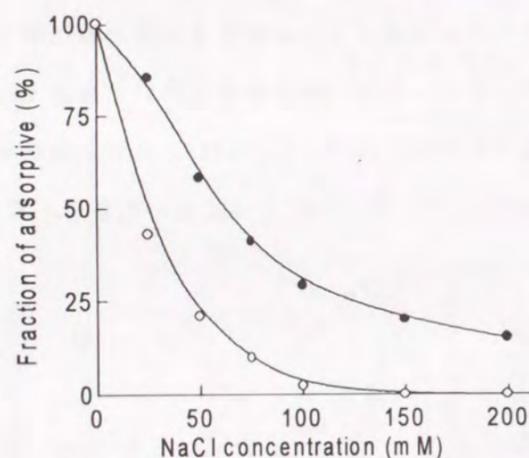


Fig. 5-6. Effect of NaCl concentration on adsorption. To 1 mg of oryzenin fraction, 1 ml of lactate buffer (pH 4.5) containing 290 units of  $\alpha$ -amylase or teichoic acid (phosphorus content 14.8  $\mu$ g), supplemented with various amounts of NaCl, was added. The suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 4°C.  $\alpha$ -amylase activity and phosphorus in the supernatant were measured. Symbols: ●, teichoic acid; ○,  $\alpha$ -amylase.

## 9. 不溶性タンパク質への吸着

$\alpha$ -アミラーゼは各種の塩基性アミノ酸を含むタンパク質やポリアミノ酸には吸着されるが、塩基性アミノ酸を含まないタンパク質やポリアミノ酸には吸着されないことが知られている(57)。不溶性タンパク質としてヒストンとフィブロイ

ンを用いて、 $\alpha$ -アミラーゼの吸着に及ぼすテイコ酸の影響を調べた。ヒストンは $\alpha$ -アミラーゼをよく吸着したが、テイコ酸画分が存在すると吸着率は68%に低下した。フィブロインには、 $\alpha$ -アミラーゼおよびテイコ酸のいずれも吸着されなかった。

## 10. イオン交換樹脂への吸着

$\alpha$ -アミラーゼは疎水性吸着体であるオクチルセファロースCL-4Bや水素結合クロマトグラフィーに用いられるセファロースパウダーには吸着されず、陰イオン交換樹脂にはよく吸着されることが知られている。 $\alpha$ -アミラーゼとテイコ酸画分を含む緩衝液を用いて、イオン交換樹脂への両者の吸着能を比較した。結果はTable 5-3に示したように、いずれも陰イオン交換樹脂に吸着されるが、テイコ酸は $\alpha$ -アミラーゼの共存によって吸着量がほとんど変化しないのに対し、 $\alpha$ -アミラーゼはテイコ酸が共存する事により吸着量が290 unitsから117 unitsと低下し、40%の吸着率となった。陽イオン交換樹脂にはどちらも吸着されなかった。

Table 5-3. Adsorption of  $\alpha$ -amylase and teichoic acid onto ion exchange resin.

Resin	Teichoic acid	$\alpha$ -Amylase	Adsorbed teichoic acid ( $\mu$ g-P)	Adsorbed $\alpha$ -amylase (U)
IRA401	+	-	9.4	n. t. *
	-	+	n. t. *	290
IRA120B	+	+	8.8	117
	-	-	0	n. t. *
	-	+	n. t. *	0

\*not tested.

## 第4節 考察

テイコ酸添加の有無による溶解量の違いが溶解初期に認められ(Fig. 5-1)、同時に液中の $\alpha$ -アミラーゼ力価はテイコ酸添加により増大した。また、これらの現象は*B. subtilis* 起源の $\alpha$ -アミラーゼを用いた際には認められなかった(Table

5-1). 清酒醪における $\alpha$ -アミラーゼの蒸米への吸着現象についての詳しい検討がなされているが(57), テイコ酸の添加によって観察される現象は, 黄麹菌由来の $\alpha$ -アミラーゼの米タンパク質への吸着をテイコ酸が阻害することにより現れると推察された. テイコ酸はオリゼニンによく吸着し, 脱離させるためには,  $\alpha$ -アミラーゼの場合に比べてより高い緩衝液濃度または塩濃度を要した(Fig. 5-5, 5-6). また, テイコ酸は $\alpha$ -アミラーゼと同様に, 塩基性アミノ酸に富むヒストンや陰イオン交換樹脂に吸着され,  $\alpha$ -アミラーゼと共存するとき,  $\alpha$ -アミラーゼのこれらへの吸着量を低下させた(Table 5-2). このことから, テイコ酸の吸着も $\alpha$ -アミラーゼと同様に静電的結合によるものと考えられる.

Fig. 5-4に示したpHの吸着量への影響については,  $\alpha$ -アミラーゼはpH3やpH6ではあまり吸着されないが, テイコ酸はpH3においても荷電状態にあり, 吸着能はオリゼニンの解離度に強く影響を受けると考えられた. このことは, オリゼニンのアミノ基やイミダゾール基に対するテイコ酸の吸着サイトがリン酸基であることによると考えられる.

米粉への $\alpha$ -アミラーゼの吸着率に及ぼすテイコ酸濃度の影響を見ると, テイコ酸の添加量の増大にともない吸着率は指数的に減少した(Fig. 5-3). このことから,  $\alpha$ -アミラーゼ吸着率の低下を, テイコ酸の増大による物理的な吸着部位の減少だけで説明する事は出来ない. 低い濃度でテイコ酸がより効果的に作用するのは, イオンポリマーであるテイコ酸が相互間の反発力に影響されずにオリゼニンの複数の吸着部位と結合し, オリゼニン表面の荷電状態を変えるためと説明することができる.

以上の結果をまとめると, テイコ酸はリン酸基を介して $\alpha$ -アミラーゼより強くオリゼニンと吸着し, オリゼニン表面の荷電状態に影響を及ぼす結果,  $\alpha$ -アミラーゼの吸着量が減少すると考えられる. 清酒醪中においては, テイコ酸は生醗中乳酸菌の自己消化により可溶化し, 米タンパク質と吸着することにより, 液

中に遊離 $\alpha$ -アミラーゼを増大させ, 溶解率が大きくなるものと考えられる.

#### 第4節 要約

$\alpha$ 化米を麹によって溶解させるとき, テイコ酸は溶解量を初期に増大させ, 液中の $\alpha$ -アミラーゼ力価が増大した.  $\alpha$ 米溶解に及ぼすテイコ酸添加効果は, *Aspergillus oryzae*由来の $\alpha$ -アミラーゼを使用した際には現れたが, *Bacillus subtilis*由来の $\alpha$ -アミラーゼを使用した際には現れなかった. 1mgの米タンパク質オリゼニンに対して, リン含量にして10 $\mu$ gまでのテイコ酸を添加したとき, 添加量の約90%が吸着された. 米粉への $\alpha$ -アミラーゼの吸着率は, 添加されたテイコ酸量に対し, 指数関数的に減少した. pHや酸濃度及び塩濃度は, オリゼニンへの $\alpha$ -アミラーゼ, 及びテイコ酸吸着量に対して異なる影響を及ぼした.  $\alpha$ -アミラーゼはpH4でもっともよく吸着されるのに対し, テイコ酸はpHが低いほど吸着された. また, テイコ酸は,  $\alpha$ -アミラーゼに比べ高い酸濃度, 塩濃度でも吸着された.

## 総括

本論文は、生醗酵母と生醗仕込の特性の要因について、明らかにしたものである。すなわち、従来生醗によって育成された酵母は、温み取りに強く、長期保存によって死滅しにくいこと、また、生醗仕込の醗は発酵は穏やかだが、醗末期でもよく発酵することは知られていたが、その要因についての検討は殆どなく、謎めいてとらえられていた。本論文ではじめてそれらの要因が、速醗醗に比べて酵母リン脂質脂肪酸組成が顕著に相違することに起因し、そのような相違が生醗製造の前段における乳酸菌の増殖の影響であることを示した。さらに、生醗中で死滅した乳酸菌が、醗初期に蒸米溶解を促進し、生醗仕込の発酵特性に関わっていることを示し、蒸米溶解促進の機作を解明した。

緒論においては、酒母製造の概要を述べるとともに本研究の意義を明らかにし、本論文の概要を述べた。

第1章では、生醗酵母と速醗醗酵母のリン脂質脂肪酸組成の相違とその要因、及び醗中での変化とその要因について検討した。

はじめに、酒母中の酵母のリン脂質脂肪酸組成について検討し、生醗酵母と、乳酸を添加することで乳酸酸性を実現する速醗醗の酵母では、リン脂質脂肪酸組成が大きく異なることを示した。原料米由来の主要脂肪酸は二価不飽和脂肪酸であるリノール酸と飽和脂肪酸であるパルミチン酸であるが、速醗醗酵母ではリン脂質中にリノール酸が顕著に認められたのに対し、生醗では殆ど認めることが出来なかった。

次に、このような相違の現れる要因について検討し、酒母環境中の遊離脂肪酸組成についても同様の相違のあることを認め、このことから、酵母リン脂質の脂肪酸組成の違いは、増殖環境が脂肪酸組成に反映した結果であることを示した。さらに、このような環境の違いによる遊離脂肪酸組成の差異は、低温下で増殖可

能な乳酸菌である *Lactobacillus sake*, *Leuconostoc mesenteroides* が増殖する際、選択的にリノール酸を取り込み利用する結果生じたものであることを示した。また、リノール酸は、これらの生醗にみられる乳酸菌に対して増殖促進作用を有しており、細胞膜の適切な流動性を低温下で維持するために、リノール酸が貢献していると考察した。

次に、清酒醗中の酵母のリン脂質脂肪酸組成について検討し、醗中で4、5回の酵母の細胞分裂があるにも関わらず、生醗酵母と速醗醗酵母の間には脂肪酸組成において酒母と同様な脂肪酸組成の相違が認められることを示した。すなわち、清酒醸造における段仕込の過程で、酵母は4、5回の細胞分裂を経るが、その間に酵母リン脂質の不飽和度は低下するものの、速醗醗仕込では酵母ホスファチルコリン中に25~30%のリノール酸が認められ、生醗酵母と速醗醗酵母の間には明らかな相違があった。

さらに、醗中で観察される酵母のリン脂質脂肪酸の不飽和度の低下の要因を検討し、醗中では酵母が4%程度のエタノール存在下に増殖することがその要因であることを示した。すなわち、パルミチン酸を含む培地で酵母が増殖するとき、エタノールの存在が酵母リン脂質中のパルミチン酸含量を増大させたのに対し、リノール酸を含む培地で生育した酵母のリノール酸含量は、エタノールの添加によって殆ど変わらずにオレイン酸が増加した。これにより、パルミチン酸の存在下では脂肪酸不飽和度の減少により酵母が増殖適応していることを示し、不飽和度の増大がエタノール環境への適応であるという従来の見解に対して、リン脂質アシル基間の疎水的結合力を大きくすることがエタノールに対する適応であると考察した。

他方、醗初期には蒸し米の溶解に伴う脂肪酸の遊離は十分でないと考えられるが、細胞内貯留脂質がリン脂質合成の際の脂肪酸源として寄与することを確認し、速醗醗仕込の酵母が高いリノール酸含量を保つ要因が、酒母酵母中に著量蓄積さ

れたトリグリセリドにあることを示した。

このように、速醸醗及び速醸醗仕込みの酵母では、環境に存在するリノール酸によってリン脂質中のリノール酸含量が増大するが、これによってホスファチジルエタノールアミン(PE)に対するホスファチジルコリン(PC)の比も増大し、リン脂質の脂肪酸組成とPC/PE比の両者によって、生醗及び生醗仕込の酵母と判別できることを示した。

第2章では、生醗中の酵母が速醸醗の酵母に比べて長期保存に耐えることを確認するとともに、パルミチン酸またはリノール酸添加培養酵母を用いて、その要因を検討した。あわせて、温み取りに対する耐性を比較するとともに、温み取りがエタノール耐性を増強する効果についても検討した。

リン脂質組成中にパルミチン酸含量の高いパルミチン酸添加培養酵母は、リノール酸含量の高いリノール酸添加培養酵母に比べてエタノール耐性が大きく、発酵能の小さいことを示した。その結果、生醗を長期保存した際に観察される、速醸醗に比べて緩やかなエタノール生成と、高濃度エタノール蓄積後の高い酵母生存率を、脂肪酸組成の違いから説明することが出来た。

また、リノール酸を添加して培養した菌体は、温み取りと同様の加温処理により細胞から顕著に物質の漏出が認められ、生存率が低下したが、パルミチン酸添加培養菌体では有意な生存率の低下が認められず、温み取り耐性も脂肪酸組成の違いを反映していることを見いだした。その結果、生醗で行われる温み取りを、速醸醗で実施すると、酵母の死滅率が高くなるということの説明が可能となった。さらに、温み取り操作を行うことによって、18~20%エタノールの存在する環境での死滅率は小さくなり、長期保存に温み取りが有効であることが示された。さらに、温み取りの際に蛋白合成を阻害するとその後のエタノール耐性の増大は消失することを示し、温み取りによって誘導されるストレスタンパク質の存在を示唆した。

第3章では、その前半部で、リン脂質の不飽和度が膜のバリアー能に及ぼす影響をリボソーム、及び酵母細胞を用いて検討した。その後半部において、エタノール環境で増殖する際に、添加脂肪酸によってもたらされる脂肪酸不飽和度の変化と、膜バリアー能、エタノール耐性の関係を検討した。

第3章前半部で、リボソームを用いたモデル系において、清酒醸造にみられるような高濃度エタノールの存在下では、エタノール濃度に応じて膜の透過能が増大すること、リン脂質の脂肪酸組成によって透過能が著しく異なることを示した。すなわち、リン脂質膜中のリノール酸含量が減り、パルミチン酸からなるリン脂質が増えるにしたがい、高エタノール存在下における膜のバリアー能は急激に大きくなった。

さらに、酵母細胞においても、リノール酸添加培養菌体に比べて、パルミチン酸添加培養菌体では、高エタノール存在下における膜透過係数が小さく保たれていることが確認された。このことから、生醗酵母は、高濃度エタノールの存在下においても、細胞膜バリアー能が大きく、このため細胞の内部環境の恒常性が維持される結果、エタノール耐性を示すと考察した。

第3章後半部では、パルミチン酸、またはリノール酸を添加した培地でエタノール存在下に酵母を培養することにより、パルミチン酸含量の増大により不飽和度の減少した菌体と、オレイン酸含量の増大により不飽和度の増大した菌体をそれぞれ調製して、検討を行った。エタノール中で増殖することによって、エタノール耐性、及び細胞膜のバリアー能が増大したが、この場合にも、パルミチン酸に富む酵母の方がエタノール耐性、細胞膜バリアー能の、いずれにおいても上回っていた。このことから、パルミチン酸の供与がエタノール中での膜バリアー能の強化と、それに伴うエタノール耐性の増強に有効であることが明きらかとなった。

一方、8%エタノール中で増殖した酵母菌体を高濃度エタノール中においたと

き、細胞内ヌクレオチドの漏出は初期には抑制され、グルコースを添加することによりこの期間は延長された。このことから、リン脂質膜脂肪酸組成に依存した構造的なバリアー能とは別に、バリアー能を大きくする適応現象があることを示した。段仕込みが持つ意義の一つとして、清酒醸造で高濃度エタノール発酵を実現するために、エタノール存在下に酵母の増殖を行わせることがあげられよう。

第4章では、乳酸菌の増殖による酵母の性質の変化に加えて、さらに死滅乳酸菌が蒸米溶解を促進する要因ともなっていることを示し、その原因物質がテイコ酸であることを明らかにした。また、モデル酒母中で乳酸菌の死滅に伴い、細胞表層から液相中に溶離するテイコ酸量をもとに、生酛仕込みの醪中に遊離していると考えられるテイコ酸量を推定した。さらに、清酒小仕込み試験においてテイコ酸添加に行い、醪初期の蒸米溶解促進に実効性があることを明らかにした。

第5章では、テイコ酸が蒸米の溶解を促進する機作について明らかにした。すなわち、アニオンポリマーであるテイコ酸は、蒸し米中のタンパク質であるオリゼニンに静電的に強く吸着してオリゼニン表面の荷電状態を変え、オリゼニンへの $\alpha$ -アミラーゼの吸着を阻害する。そのため、醪中の $\alpha$ -アミラーゼ活性が増大し、蒸米溶解が促進されることを示した。

醪初期にみられる、死滅乳酸菌による蒸米溶解の促進は、「生酛で仕込んだ醪は発酵が穏やかであるが、醪末期でもよく発酵する」と言われる一因になっていると考えられる。また、醪初期に蒸米溶解促進によって液相の割合が大きくなることによって、エタノール存在下に増殖する菌体量が増加し、さらに酵母がエタノール耐性を獲得するためにも有効に働いていると考えられる。

このように、生酛中の乳酸菌は、従来から言われている乳酸生成作用に加えて、酵母リン脂質の脂肪酸組成と原料米溶解の両面に影響を及ぼして、生酛仕込について言われている特性を支えているものと考えられる。

## 使用記号説明

### 脂質

PL	リン脂質
PC	ホスファチジルコリン
PE	ホスファチジルエタノールアミン
PI	ホスファチジルイノシトール
PS	ホスファチジルセリン
TG	トリグリセリド
FS	遊離ステロール
SE	ステロールエステル
WE	ワックスエステル
FFA	遊離脂肪酸
12:0	ラウリン酸
14:0	ミリスチン酸
14:1	ミリストオレイン酸
16:0	パルミチン酸
16:1	パルミトオレイン酸
18:0	ステアリン酸
18:1	オレイン酸 (またはパクセン酸)
18:2	リノール酸
18:3	リノレン酸
$\Delta$ /mol 脂肪酸不飽和度, (% monoene + 2[% diene]) /100	

式

- $F_n$  カルセイン封入リポソームの蛍光強度(初発時  $F_0$ )
- $F_e$  消光されないカルセインの平衡濃度による蛍光強度
- $r$  トリトンX-100による希釈ファクター
- $P'$  ヌクレオチドの細胞膜透過係数(cm/h)
- $t$  培養時間(h)
- $C_e$  細胞内の溶質濃度(mol/cm<sup>3</sup>)  
初発時( $t=0$ )の濃度  $C_e^0$ , 平衡時( $t=\infty$ )の濃度  $C_e^\infty$
- $A$  全細胞表面積(cm<sup>2</sup>)
- $V_i$  全細胞内液容積(cm<sup>3</sup>)
- $V_e$  細胞外液の容積(cm<sup>3</sup>)
- $v$   $V_i/V_e(-)$
- $A_{260}$  260nmにおける吸光度
- $A_{280}$  280nmにおける吸光度

その他

- $Q_{CO_2}$  窒素ガス置換後の発酵活性( $\mu$ l CO<sub>2</sub>/hr/ $2 \times 10^8$  yeast cells)
- KAA *Aspergillus oryzae*起源の $\alpha$ -アミラーゼ
- BAA *Bacillus subtilis*起源の $\alpha$ -アミラーゼ
- U Wohlgemuth価

引用文献

1. 秋山裕一: 改訂清酒酵母の研究(清酒酵母研究会編), p.283-288, 清酒酵母研究会(1980)
2. 佐藤俊一: 醸協, 85, 148-154(1990).
3. Hayashida, S., Feng, D. D., Ohta, K., Chaitium-vong, S., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 40, 73-78(1976).
4. 上原悌次郎, 山本みどり: 醸協, 87, 773-779(1992).
5. 吉沢 淑, 石川雄章, 野白喜久雄: 農化, 47, 713-717(1973).
6. 石川雄章, 吉沢 淑: 発酵工学, 56, 24-30(1978).
7. 吉沢 淑, 石川雄章: 醸協, 74, 148-152(1979).
8. Chen, R. F.: *J. Biol. Chem.*, 242, 173-181(1967).
9. Bligh, E. G., Dyer, W. J.: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-919(1967).
10. 藤井安彦: 脂質分析法入門, p.93, 学会出版センター(1978).
11. 植田伸夫: 化学と生物, 17, 744-752(1979).
12. Ishikawa, T., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45-53(1979).
13. Kaitaranta, J. K.: *J. Chromatogr.*, 205, 339-347(1981).
14. Uchida, K., Mogi, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 109-129(1972)
15. 児玉礼次郎: 乳酸菌の研究(北原覚雄編), p.263-264(1966).
16. Wijayarante, S. C., Ohta, K., Chavanich, S., Mahamontri, V., Nilubol, N., and Hayashida, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 827-832(1986).
17. 石川雄章, 吉沢 淑: 農化, 50, 131-136(1976).
18. Beavan, M. J., Charpentier, C., Rose, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1447-1455(1982)
19. Buttke, T. M., Ingram, L. O.: *Biochemistry*, 17, 637-644(1978).

20. Buttke, T. M., Ingram, L. O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 203, 565-571 (1980).
21. Ingram, L. O., Buttke, T. M.: *Adv. Microb. Physiol.*, 25, 253-300 (1984).
22. 堀 太郎: 生体物質の化学構造と機能(日本化学会編), p.169-194, 学会出版センター(1974).
23. Row, E. S.: *Biochemistry*, 26, 46-51(1987).
24. 吉沢 淑, 大島秀隆, 角田潔和, 小泉武夫: 醸協, 91, p.284-289(1996).
25. Dembek, K. M. and Ingram, L. O.: *J. Bacteriol.*, 157, 233-239(1984).
26. 灘酒研究会: 灘の酒用語集, p.102-103(1979).
27. Hayashida, S., Feng, D. D., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1025-1031(1975).
28. 佐見 学, 杉下朗夫, 藪内精三: 日本生物工学会大会要旨集, p.57(1992).
29. Hayashida, S., Feng, D. D., Hongo, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2001-2006(1974).
30. 長西廣輔: 微生物学ハンドブック(微生物学ハンドブック編集委員会編), p727-728, 技報堂(1957)
31. Shibuya, I., Honda, H., Maruo, B.: *Agric. Biol. Chem.*, 31, 111-114 (1967)
32. 佐藤俊一, 田中裕之, 山崎教和, 梁瀬文広, 下飯仁, 斉藤和夫, 家藤治幸, 蓼沼 誠: 醸協, 84, 183-187(1989).
33. 佐藤俊一, 田中裕之, 下飯仁, 斉藤和夫, 家藤治幸, 蓼沼 誠: 醸協, 84, 183-187(1989).
34. van Uden, N.: *Adv. Microb. Physiol.*, 25, 195-251(1984).
35. Cabeca-Silva, C., Maderica-Lopes, A., van Uden, N.: *FEMS Microbiol.*

- Lett.*, 1982, 15, 149-151(1982).
36. van Uden, N.: *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.*, 1, 263-272(1984)
37. 寺田 弘, 吉村哲朗: ライフサイエンスにおけるリボゾーム実験マニュアル, p.165-184, シュプリンガー・フェアラーク東京(1992).
38. Takeshige, K. and Ouchi, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 11-16(1995).
39. Osman, Y. A., Ingram, L. O.: *J. Bacteriol.*, 164, 173-180(1985).
40. 土肥和夫, 大谷茂夫, 菅原一男, 谷後武司, 大谷正人, 内野文弘: 日本発酵工学会大会要旨集, p.21(1984).
41. Oku, N., Kendall, D. A., Macdonald, R. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, 691, 332-340(1982).
42. Rose, E. S.: *Biochemistry*, 26, 46-51(1987).
43. Hubbel, W. L., McConnel, H. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 314-326(1971).
44. Butler, K. W., Smith, I. C. P., Schneider, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 314-326(1971).
45. Darke, A., Finer, E. G., Flook, A. G., Philips, M. C.: *FEBS Lett.*, 18, 326-330(1971).
46. Oldfield, E., Chapman, D., Derbyshire, W.: *FEBS Lett.*, 16, 102-104 (1971).
47. Darke, A., Finer, E. G., Flook, A. G., Philips, M. C.: *J. Mol. Biol.*, 63, 265-279(1972).
48. de Gier, J., Mondersloot, J. G., van Deenen, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 655-665(1968).
49. de Gier, J., Mondersloot, J. G., van Deenen, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 655-665(1968).
50. Sakurai, Y., Lee, T. H., Shita, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 31, 111-114

(1967).

51. Cummins, C. S., Harris, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 14, 583(1956).
52. Armstrong, J. J.: *J. Chem. Soc.*, 4344(1958).
53. 永谷正治, 水谷行夫, 難波康之祐: 発酵工学, 51, 178-182(1973).
54. 竹友直生, 佐藤吉朗, 佐々木隆: 農化, 62, 1655-1657(1988).
55. 沢田治司, 平井孝一, 本池真帆子, 三沢宏, 小林精三郎, 綿貫雅章, 横倉輝男: 農化, 64, 707(1990).
56. 椎木 敏, 立松悦典, 布川弥太郎: 発酵工学, 60, 145-149(1982).
57. 椎木 敏, 土橋潤三, 島田豊明, 布川弥太郎: 農化, 58, 261-266(1984).
58. 石川雄章, 布川弥太郎: 農家, 44, 21-28(1970).
59. 村上英也: 第3回改訂国税庁所定分析法注解, p.218-221(1981).
60. 藤田栄信, 杉本芳範, 田中伸哉, 吉田敏臣, 田口久治: 発酵工学, 62, 63-72(1984)
61. 椎木 敏: 醸協, 79, 840-845(1984).

本論文に關係する主な報告

- (1) 生醗中より分離された乳酸菌による蒸米溶解促進と作用因子の分画.  
溝口晴彦, 鶴本真人, 古川彰久, 川崎 恒: 発酵工学, 69, 211-217  
(1991).
- (2) 生醗中の乳酸菌に由来するテイコ酸の $\alpha$ 化米溶解促進作用機作.  
溝口晴彦, 鶴本真人, 古川彰久, 川崎 恒: 発酵工学, 69, 219-224  
(1991).
- (3) 生醗で育成された酵母のリン脂質脂肪酸組成に及ぼす乳酸菌の影響.  
溝口晴彦, 原 昌道: 生物工学, 72, 147-173(1994).
- (4) 生醗における枯らし中の酵母生存率に及ぼす酵母の生理的性質.  
溝口晴彦, 池田 朋, 原 昌道: 生物工学, 72, 355-361(1994).
- (5) Differences in the Intracellular Lipids of Sake Yeast in Main Mash Seeded Respectively with Two Kinds of Seed Mash: *Kimoto* and *Sokujo-moto*.  
Haruhiko Mizoguchi, Tomo Ikeda, Shodo Hara: *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 586-591(1995).
- (6) Effect of Fatty Acid Saturation in Membrane Lipid Bilayers on Simple Diffusion in the Presence of Ethanol at High Concentration.  
Haruhiko Mizoguchi, Shodo Hara: *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 395-401  
(1996).
- (7) Ethanol-induced Alterations in Lipid Composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the Presence of Exogeneous Fatty Acid.  
Haruhiko Mizoguchi, Shodo Hara: *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 12-16  
(1997).

## 謝辞

本論文をまとめるに際し、御懇篤なる御指導と御高配を賜りました大阪大学工学部 菅 健一教授に深甚なる感謝の意を表します。また、懇切なるご助言、ご教示を賜りました大阪大学工学部 山田靖宙教授、塩谷捨明教授、原島 俊教授に心から感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、その機会を与えていただきました菊正宗酒造（株）研究所前所長故川崎 恒博士、渡辺和夫技術顧問、並びに終始懇切なご指導と過分の御鞭撻を戴きました菊正宗酒造（株）常務取締役原 昌道博士に衷心より謝意を表します。

さらに、本研究遂行に際し深い御理解を示され、御指導と過分の御便宜をはかって戴きました菊正宗酒造（株）古川彰久生産部長に厚く御礼申し上げます。

併せて実験に協力していただいた鶴本真人氏、谷口（池田）朋氏に感謝いたします。

