

[醸工 第45巻, 第3号, p. 241~245, 1967]

糖蜜のアルコール醗酵におよぼす電解質濃度の影響

(第2報) 高濃度電解質の酵母カルボキシラーゼに対する
阻害効果

梅本春一・入江淑郎・今井富雄

(合同酒精株式会社中央研究所)

The Effect of Electrolytes Concentrations on Alcoholic Fermentation of Molasses

(II) Inhibitory Effect of High Concentrations of Electrolytes on Yeast Carboxylase

Shunichi Umemoto, Yoshio Irie and Tomio Imai

(Central Research Lab., Godo-Shusei Co. Ltd., Matsudo, Chiba)

From the results reported in the previous paper, it was suggested that among the enzymes of the E.M.P. pathway, carboxylase is comparatively more inhibited by high concentrations of electrolytes (H.C.E.), and consequently, glycerol production was accelerated.

The present investigation was undertaken to examine the inhibitory effect of H.C.E. on the activity of yeast carboxylase.

The results obtained are summarized as follows;

1. In the solution of H.C.E., carboxylase activity was remarkably inhibited. At the same level of molar concentration, the inhibition degree was varied with anion-moiety, and its order was as follows; $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-}$.
2. This inactivation of carboxylase was assumed to be reversible, because the activity was almost completely recovered by dialysis. And it was also noted that its inhibition type of it was non-competitive as shown in Fig. 2.
3. Fermentable activity of frozen yeast cells was more inhibited than that of intact cells by H.C.E..
4. The inhibitory effect of H.C.E. on yeast carboxylase is probably not against its formation but against its activity.

緒 言

前報¹⁾においては高濃度に電解質を含む糖蜜をアルコール醗酵原料とした場合に認められた醗酵阻害が glycerol などの生成量の増加と関係があること, この現象がいかなる電解質によってもその濃度が高いときに起るこ

とを報告した。そしてこの醗酵阻害はただ単なる酵母の増殖阻害のみにとどまらず、福井ら²⁾の報告のごとく、E. M. P. 酵素系のなかの carboxylase (pyruvate decarboxylase) 活性が相対的に抑制されるために glycerol の生成が促進されるのではないかと予想されたので、本報では酵母の carboxylase 活性におよぼす電解質濃度の影響について検討した結果を報告する。

実験方法

1. Carboxylase 粗標品の調製 70%程度の水分含量とした洗浄圧搾パン酵母 500 g を細かくくぐりて粉状とし、3 l の冷 acetone 中に投入して撹拌しながら10分経過後、吸引濾過し、さらに 1 l の冷 acetone と混じり撹拌、同様に濾過して粗粉状とした。これを 250 ml の ether で3分間処理して、濾過脱液し、低温で一昼夜乾燥した。

このものは zymin と称され³⁾、低温で長期にわたり保存可能である。これを glucose と反応させても炭酸ガスの放出が認められず、pyruvate を基質としたときに炭酸ガスが理論量発生したので carboxylase 標品として使用することにした。

2. Carboxylase 活性の測定法 一定量の基質、Na-pyruvate と酵素標品とを加え、pH 5.0, 30℃でインキュベートし、Warburg 検圧計を使って炭酸ガス放出量を経時的に測定した。電解質無添加のものを対照として、各種電解質の種々の濃度における初期の炭酸ガス発生速度で活性を比較した。使用した電解質はいずれも特級試薬を活性炭で再結したものである。

実験結果と考察

1. 各種電解質の濃度と carboxylase 活性 酵母の carboxylase が *p*-chloromercuribenzoate, trivalent organic arsenicals, mercaptide-forming cation としての Ag^+ , Hg^{++} , Cu^{++} , などによって可逆的な阻害を受けることは従来知られており^{4,5)}、また oxythiamine triphosphate も拮抗的な阻害剤として知られている⁶⁾。しかしながら電解質濃度による阻害に関する報告はいまだ見当たらないようである。

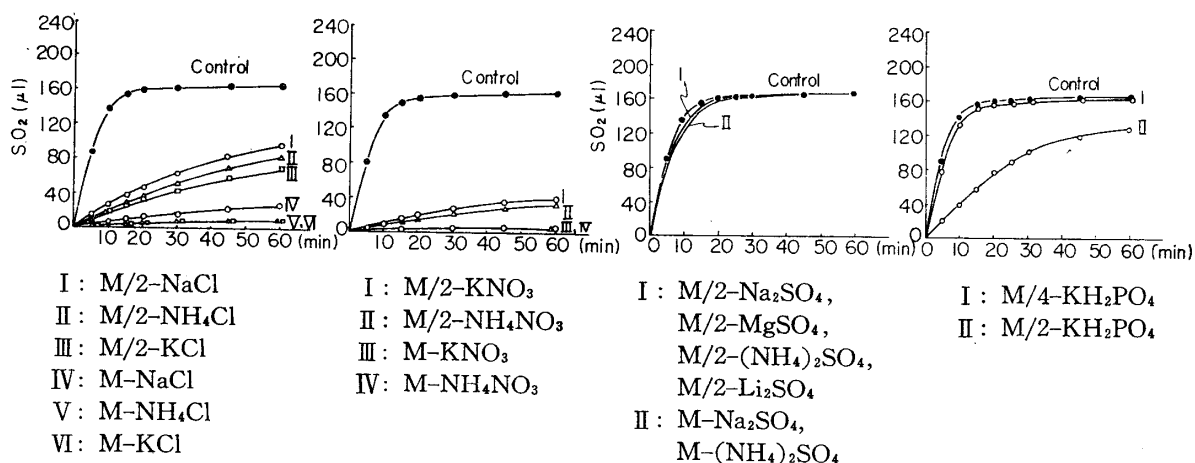


Fig. 1. Effect of various electrolytes of high concentration on carboxylase activity.

The plots are shown for the time-course of CO_2 evolution.

The reaction mixture contained 7.5 μM Na-pyruvate, 10 mg zymin, 1.0 mM Mg^{++} , 0.1 mM thiamine pyrophosphate and 50 mM phosphate buffer (pH 5.0) in a total volume of 2.0 ml.

よって著者らは各種電解質濃度が yeast carboxylase 活性におよぼす影響についてしらべた。すなわち 7.5 μM の Na-pyruvate と 10 mg の酵素標品とを pH 5.0 の phosphate buffer solution 中で、 Mn^{++} と thiamine pyrophosphate の存在下でインキュベートしたときの反応曲線は Fig. 1のごとくであった。

コントロールに比べ、 Cl^- , NO_3^- の高濃度では著しい阻害が見られた。同一モル濃度で比較すると陰イオンの種類によってかなりの差異があり、阻害の強い順にならべると $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{--}$ となった。

しかし、モル濃度以下の SO_4^{2-} によってはほとんど阻害されなかった。

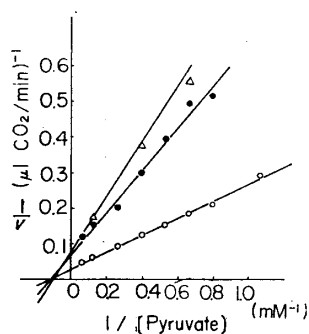
2. 高濃度電解質による carboxylase 活性阻害の可逆性 高濃度の電解質により阻害された carboxylase の活性が可逆的かまたは非可逆的であるのかを電解質として NaCl を使って検討した。酵素標品を NaCl 溶液に 15°C で 1 時間インキュベートし、 5°C で 3 時間透析を行なって残存活性を測定した。活性の測定条件は従前通り、Warburg 検圧計で測定した、その結果を Table 1 に示す。表から判るごとく、NaCl を添加したものは活性の低下を起すが、透析するとあらかじめ添加した NaCl 濃度の高低にかかわらず、いずれもほとんど完全に活性を回復した。この結果より NaCl による carboxylase 活性の阻害は可逆的であると言える。

Table 1. Changes of carboxylase activity after dialysis.

NaCl-concn.* before dialysis	Period of dialysis	NaCl-concn. at the time of assay	Per cent recovery (activity)
none	none	none	100
none	4 hr	none	92
none	none	0.5 M	21
none	none	1.0 M	6
0.5 M	4 hr	negligible	93
1.0 M	4 hr	negligible	92

* The enzyme solution was preincubated with NaCl for 30 minutes at 15°C preceding the dialysis.

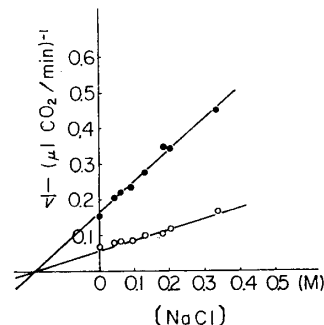
3. 高濃度電解質による carboxylase 活性阻害の様式 電解質濃度による carboxylase 活性阻害の様式をしらべるために Lineweaver-Burk の式を適用して、基質濃度と初速度との関係を検討した。その結果 Fig. 2 のごとく直線関係が得られ K_m 値は $1.0 \sim 1.7 \times 10^{-2} \text{ M}$ であった。



Inhibition of carboxylase activity by NaCl.

Lineweaver-Burk plots are shown for the reaction of carboxylase with Na-pyruvate in the absence (○) and presence (●: M/5, △: M/4) of NaCl.

The reaction was carried out for 5 min at 30°C and pH 5.0.



Effect of NaCl concentration on the reaction rate.

(○): M/133 Na-pyruvate
(●): M/667 Na-pyruvate

Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of yeast carboxylase.

また Green ら⁴⁾の報告では 3×10^{-2} であった。

基質濃度を上げて活性の回復は余り見られず、図より判断すると非拮抗的な阻害であると考えられた。

4. 凍結融解処理酵母の醗酵能 intact cell における醗酵能と粗酵素標品の carboxylase 活性とを各種電解質の存在下で比較してみたとき、阻害度は intact cell の方が緩和されていることが今までの結果からわかった。よって、つぎに凍結融解処理をして細胞膜の透過性を増した場合について高濃度電解質の影響をしらべた。 -20°C で数回処理した菌体を使い、未処理の酵母を対照にして glucose 醗酵能の比較を行なったところ Fig. 3

のごとき結果が得られた。すなわち未処理酵母に比べ、凍結融解処理の酵母は電解質濃度の影響をより強く受けるようである。したがってこの結果から各種電解質による carboxylase 活性の阻害は intact cell においては細胞膜のために緩和されていると考えられる。

5. 加塩培地に生育した菌体の carboxylase 活性 高濃度に電解質を含む培地で増殖した菌体と、電解質を含まない基礎培地に生育した菌体とでは、carboxylase 生成量に差があるか否かをしらべた。inoculum size を小さくして無塩培地と加塩培地とに醸研1号菌を培養、集菌し、従来通りの方法で carboxylase 活性の比較を行なった。

実験条件：培地は従前の合成培地をもとにして NaCl 欠培地、M/2-NaCl 添加培地、1M-NaCl 添加培地をそれぞれ調製した。inoculum size は 2×10^6 cells/ml で、 30°C で2日間静置培養した。培養後、菌体を遠心分離し蒸留水で洗浄した後、菌数を3者それぞれ一定にして小遠沈管に採り、遠沈脱水した菌体を低温で3者同一条件にて acetone 処理, ether 処理をして zymin を得た。この zymin を使って従前の方法で carboxylase 活性の測定をした。その際の酵母数は 3.04×10^8 で、 $7.5 \mu\text{M}$ の Na-pyruvate と反応させた。加塩培地では酵母の形態がやや小さくなるのでさらに zymin の重量当りの活性も測定し、その結果を Table 2 に示した。この表よりわかるごとく、加塩培地では酵母の増殖が阻害されるが、菌体内の carboxylase の活性は菌数当り

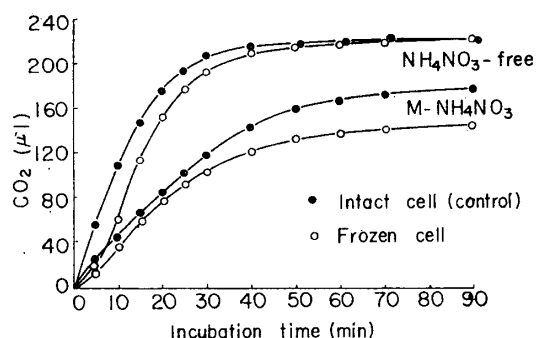


Fig. 3. Fermentable activity of frozen cell in the absence and presence of electrolyte.

The incubation mixture contained $5 \mu\text{M}$ -glucose, 20 mg. baker's yeast, 10^{-3} M- NaN_3 and 50 mM-phosphate buffer (pH 5.0) in a total volume of 2.0 ml.

Table 2. Activity of carboxylase in cells grown in NaCl media.

Medium (Synthetic)	Cell concn. after 2days-culture ($\times 10^8$ /ml)	Activity *		
		I	II	III
NaCl-free (control)	1.22	32.0	32.3	5.3
Plus M/2-NaCl	0.25	32.6	35.1	5.0
Plus M-NaCl	0.17	25.3	38.2	4.5

* Carboxylase activity was measured in the absence (I, II) and presence (III) of M/2-NaCl.

Activity unit: I and III, $\text{CO}_2 \mu\text{l}/\text{min}/3.0 \times 10^8$ cells; II, $\text{CO}_2 \mu\text{l}/\text{min}/10 \text{ mg-zymin}$

では NaCl 濃度が高くなると幾分低くなるようである (I) が、調製した zymin の重量当りではかえって加塩培地に生育した酵母の方がやや高いようである (II)。

またこれらは NaCl 存在下で活性を測定すると (III) いずれも激減する。この結果から NaCl は酵母の carboxylase 生成を阻害しているのではなくて、carboxylase の作用を阻害しているものと考えられた。

総 括

酵母の carboxylase 活性におよぼす高濃度電解質の影響について検討しつぎの結果を得た。

- 1) 高濃度の各種電解質により carboxylase の活性が著しく阻害されるが、同一モル濃度では陰イオンの種類によって阻害度が異なり、その順序は $\text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{SO}_4^{2-}$ であった。
- 2) 高濃度電解質による carboxylase 活性の阻害は可逆的であって、透析により活性が回復した。また阻害の様式は非拮抗的と考えられた。
- 3) 凍結融解処理した酵母菌体は intact cell に比し醸酵能において、電解質による阻害をより強く受けた。

4) 高濃度電解質による carboxylase 阻害は, 酵素生成の阻害ではなく, 作用の阻害であるものと考えられた。

終りにのぞみ, 終始御指導をいただいた当社中央研究所の諸兄および, 発表の機会を与えられた石家社長, ならびに堀常務に対して謝意を表します。

本報告の一部は昭和40年度の日本醗酵工学会で発表した。

文 献

- | | |
|--|--|
| 1) 梅本, 入江, 今井: 本誌, 45 , 117 (1967). | 5) Barron, E. S. G., Singer, T. P.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 157 , 221 (1945). |
| 2) 福井, 茂原: 本誌, 29 , 198 (1951). | 6) Velluz, L., Herbain, M.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 190 , 241 (1951). |
| 3) 北原: 酵素研究法 (朝倉) 3 , 23 (1961). | |
| 4) Green, D. E., Herbert, D., Subrahmanyam, V.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 138 , 327 (1941). | (昭41. 6. 18受付) |