醗酵と酸化還元電位(2)

本 江 元 吉 (九州大学農学部農芸化学教室)

4. 各種酸化還元系の標準電位

諸種の redox 系の標準電位は、生体内系も含めて、次々と測定されてきている。生体内系の一例を第2表に示す。FAD や DPN は単独のときと蛋白と結びついたときとで標準電位が違ふ。また FAD が蛋白と結びついた酵素相互間でも、蛋白担体によって違い、旧黄色酵素とキサンチン酸化酵素とでは 400 mV もの差を生じている。一方、ORP は酸化還元反応に伴う自由エネルギー変化と一次関係にある ($-ΔF=nFE$) ので、この自由エネルギー尺度を redox 系の標準電位尺度と対位させることができる。したがって、ある系から他の系へ水素が移ったときどれ位のエネルギーが発生するかは、両系間の差からほぼ知ることができる。例えばアルコール醗酵であれば、アルコール1分子について約 9,000 cal の自由エネルギーができ、これが呼吸されると約 47,000 cal が生ずるわけである。

5. 菌類の生化学的機能と ORP

第2表の redox 系の順列からすれば、これらの系のうちのいくつかを組み合せて酸化還元が営まれる際に、ORP 的な至適域が劃されはしないかと考えられる。事実、筋解糖やグルコース・酵母抽出液・redox 色素系の好気反応、諸種の酵素作用などに対して ORP 至適域が存することが証せられている。また、*E. coli* のガス発生に対しては -350 mV⁽³⁶⁾、*Azotobacter agile* の窒素固定には rH22~24⁽¹⁶⁾、醋酸菌のエタノール酸化には rH 7~8、醋酸の酸化には 20~22⁽¹⁷⁾ が適 ORP と報ぜられている。

6. 醗酵の動相の考究

第2表に掲げた諸 redox 系の標準電位は、これを単なる分析的知見に終らせずに、それらを総合して、秩序をもって調整された生物の機能を全体として把握するための素材とすることが望ましい。菌類の培養でも経時的に変動する培養電位は変化の動的平衡の表われとみることができ、この培養電位を標識にしてこれらの素材を組み立てれば、全経過にわたって redox 代謝系の挙動を総合的に考究できると考えられる。すなわち培養電位は、その本体はわからぬにしてもおそらく微生物に由来する電動能 redox 系が呈するものであり、この系は細胞内外を出入して、細胞内の ORP の状態を現わすと考えられる。細胞内電位は、そこに働いている諸 redox 系によって左右されていると考えられる。かりに標準電位に高低がある二つの redox 代謝系だけがあつて、これがこの出入する電動能 redox 系を介して酸化還元するとすれば、低系による還元と高系による酸化との度が等しいときには、電動能系の酸化系と還元系との比は変らないから、ORP はこの系の電位範囲のある一点に留り、高系による酸化の度がまされば酸化型がまして上にずれ、低系による還元がまされば下にずれる。電動能系の濃度はごく低いことが必要で、濃度が高いとずれが僅かになる。当初に降下してきた培養電位はこのようにして呈せられる電動能系の電位範囲に保留され、高系と低系との強さによって上下する。高低両系が電動能のない redox 系を介して酸化還元し、電動能 redox 系が別に存したとしても、電位範囲が近いならば、その状態は刻々にこの電動能系に反照して、同様な現象が呈せられる。酒精醗酵やホセ乳酸醗酵はこの簡単な型である。二つの系だけでなく、それ以外の redox 代謝系もこの電動能系に働くときは、その効果が累算されて電位に現われると考えられる。したがって呼吸のように複雑ではなく、酒精醗酵ほどには簡単でない醗酵では、働いていくつかの redox 代謝系のうちその時々にとどの系が強く働いているかを培養の電位曲線からうかがうことができる。ORP にはこのような用い方もあるわけである。ブタノール醗酵についてこれを試みた結果は、最近の本誌に報じた⁽⁴⁾のでここに再述することは避ける。ただこの場合には窒素を通泡しつつ ORP を測定しないと水素ガス発生のため培養電位が -420 mV (pH 7) 近くに固定される恐れがあることを附言するとどめる。酒精醗酵も、原料が糖質ではなく澱粉質で、糊を加えて醗酵させる場合には、複雑になって様子が変わってくる。これについては1昨年来本誌に報ぜられている⁽²⁾。速醗酹仕込みの酹では、水麹から膨れまで糖化だけが行われている間は電位が

* Application of Oxidation Reduction Potential to Fermentation. By Motoyoshi HONGO
(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第2表 生物酸化還元系の標準電位

上がり rH 19~21 を保ち、酵母を添加して醱酵が盛んになると電位は低下する。しかし酵母は標準電位の高い redox 系ももち、麴の中にも高い redox 系があるので、培養電位は一きには下がらない。丸冷しの翌日頃最低値 (rH 11) に達し、その後枯し期間中に少しずつ再上昇する。醗でも同様で、留後 2~3 日の糖化作用がよく行われている間は、電位は上がって rH 13 前後であるが、醱酵が盛んになると低下し、引泡後に最低の rH 7 に達する。熟成に近づくにつれて少しずつ上昇し、アルコール添加で急昇し、その後上槽で空気にふれて上がるが、各系間に徐々に酸化還元が行われて滓引きまでに降下し、滓引き、濾過で空気にふれて上昇する。このように並行複醱酵の様子がよく ORP からうかがうことができる。吟醸仕込みでも、成功したものと失敗したものについて電位経過の相違が明確に示されているが、これについては紙数の関係で割愛する。他方、ブタノール醱酵で、移植によって起る醱酵速度の増進を、移植回数が多い培養と少い培養との ORP の相違を手がかりにして解明しようとした試みがあるが、これも最近本誌に報ぜられたもの⁽⁴⁾であるので省略する。

7. 微生物群の動態の考究

培養電位はまた、いくつかの菌種が働く混合培養でも、その時々どの菌が強く働いているかを考究する手がかりにすることができるように考えられる。上述の清酒醸造での麴と酵母とが、その一つであるが、麴の方はむしろその酵素作用であった。この場合の例としては山鹿配仕込みの電位が測定されている⁽²⁾。配の電位経過で膨れの前に低下がみられ、これは硝酸還元菌や乳酸菌の生育に相当するものである。その後これらの菌の機能が弱って糖化作用が進むと電位が上がって膨れに達し、湧きついて酵母の醱酵が旺盛になると低下している。

8. 酸化還元色素添加による醱酵の転換

redox 色素は、染色や ORP 指示薬として使われるとともに、各種の脱水素酵素の研究やいわゆる methylene blue 呼吸 (酸素消費増加) の研究に最も屢々使用された。菌類では、乳酸菌でフラビンによる酸素消費増加、パン酵母で redox 色素による酸素消費増加、酵母抽出液で標準電位の比較的高い redox 色素による醱酵阻害や特定の標準電位をもつ色素による好氣的糖分解の促進、*Azotobacter* で redox 色素による呼吸抑制⁽³⁷⁾が見られた。その他、菌類の分類に対しても使用が試みられており、標準電位の違う色素を還元する能力によって *Rhizobium* 属菌株を数群に分けることができるという⁽³⁸⁾。なお酵母の脂肪生成は或る種の quinone derivatives 添加によって促進されることが示されている⁽³⁹⁾。醱酵と多少とも関連があるものをあげると、酵母では H^+ や K^+ の吸収や排出が色素によって影響され⁽⁴⁰⁾、*E. coli* の穿刺培養での生酸は標準電位の高い色素の添加によって抑制される⁽⁴¹⁾。また、*Acetobacter melanogenum* のソルビット→ソルボース酸化は適濃度の methylene blue 添加によって培地中の深部でも浅部と同程度に行われ⁽⁴²⁾、醋酸とキッソウ酸あるいはプロピオン酸と酪酸を生ずる *Clostridium* 属や *Eubacterium* 属その他の菌種を、色素含有培地で 20~40 回移植すると、醋酸と酪酸とだけを生ずる stable mutant になることが示されている⁽⁴³⁾。その他 *Lactobacillus delbrueckii* の抽出液はフラビンか phenosafranin を加えればビルビン酸の dismutation を行うという報文もある。しかし、醱酵そのもので適確な効果を伴ってこれが使用されることはなかった。前に述べた redox 系の標準電位からすれば、単に二つの系だけの酸化還元で醱酵するものではなくて、いくつかの系を働かせその系の標準電位に差があるものであれば、ある特定の二系の間に標準電位をもつ redox 系を加えるとその二系間の酸化還元が促進されと考えられる。例えばブタノール醱酵では、ブタノールが生成される主系の標準電位は rH_0 4.8 附近にあり、アセトン生成系は rH_0O 系と結びついているから、水素供与系の rH_0 0.8 附近とこの 4.8 との間に rH がある redox 系 (例えば色素) を加えれば、酪酸やブタノールの生成が増すと考えられる。事実、これらの色素添加によって

第 3 表 酸化還元色素添加によるブタノール醱酵のソルベント量比変転
洗菌生菌体使用、グルコース原糖濃度 3~4%、醱酵温度 37°、糖消費率はどれも 98% 以上

色 素	無添 加	neutral red ^(20,44) ($E_0' = -325mV$) 6.0 mM	benzyl viologen ($E_0' = -359 mV$) 0.4 mM	methyl viologen ($E_0' = -446mV$) 1.2 mM
ソルベント (対消費糖収率)				
アセトン	9.0	3.8	1.8	1.8
ブタノール	19.4	29.0	29.0	28.7
エタノール	3.8	1.5	3.4	4.2
全ソルベント	32.2	34.3	34.2	34.7

第 3 表に示すように、アセトンの生成はブタノールの生成に転換される。どのようにしてこの転換が生起されたのか、*Lactobacillus delbrueckii* の抽出液に加えたフラビンがビルビン酸脱水素酵素の FAD と乳酸脱水素酵素の FAD との間で水素通伝

を行い⁽⁴⁵⁾、また *Cl. kluyveri* の透析 DPN 酸化酵素系に加えた FAD とフラビンが次々と水素を酸素にまで通

伝する⁽⁴⁶⁾ように、添加色素が水素供与系とブタノール生成系との間に介在して水素運伝を補助したのによるものか、それとも環境電位をブタノール生成系の標準電位にひきつけることによって影響したものであるか、そのいずれかは今のところ今後の研究に俟たなければならない。

9. 応用方面での ORP の利用

ORP は醗酵生産関係でも使用されている。

ブタノール醗酵では、銅製の器具を使った玉蜀黍穂芯の酸糖化液が銅イオンを含むために ORP が高くて湧きつかないのを、銅よりも標準電位の低い鉄の粉を加えて ORP を下げ、正常に醗酵させることができた例がある⁽⁴⁷⁾。また、この醗酵では培養電位の極小が2回現われるが、その電位降下期に種菌として用いると醗酵状態がよいことが指摘⁽¹⁹⁾・説明⁽⁴⁸⁾されている。

葡萄酒でも醗酵経過や製品の ORP は屢々測定され検討されている⁽⁴⁶⁾。一例をあげると、葡萄果は成熟当初には rH 22.7~25.0 であるが成熟につれて 18.0~20.0 に下がる⁽⁴⁹⁾。これを漬砕すると空気にふれて ORP は多少上がり 22 になる。湧きついてきたとき 14 で、醗酵旺盛期には7まで下がる。終ると9になる。輸送すると空気にふれて 15 に上がり、ブランデーをませ火入れ冷却すると 18~20 に上がり、貯蔵熟成中にまた下がって行く⁽⁵⁰⁾。貯蔵中に上がると、色がぬけたり褐色になったり、コロイド状の鉄の混濁ができたりする。製品の良質のものは rH 16.0~21.5、悪質のもの鼠臭がして味の変なものそれより以上の 25 位を呈すると報ぜられている⁽⁴⁾。したがって ORP を下げるために、主醗酵の後でアスコルビン酸を 20~100 mg/L 加えると、適 ORP に保たれて香味清澄がよいといわれており⁽⁵¹⁾、また標準電位の低い redox 系 (pyroacemic acid-lactic acid) を加えて熟成を促進する特許もある⁽⁵²⁾。また水素ガスを通気すると rH で約5単位下がって 16 附近になり、25 日目に検して香味が非常によくなったと報ぜられている⁽⁵³⁾。このように醗酵管理や品質改良の際の目安として ORP が使われている⁽⁵⁴⁾。

ウイスキーでも、貯蔵の際に熟成の初期に ORP が下がると報ぜられている。

麦酒⁽⁵⁵⁾でも醗酵が盛んなときには rH が 7~10 に下がっている。その後不注意に操作すると、ORP が上がり rH は恐らく 16~17 になり、にごりを起す原因になる。この rH では酵母ことに野生酵母がよく繁殖し⁽⁵⁶⁾、また蛋白の酸化なども起ってにごってくることになる。いわゆる日光臭も rH 13 をさかいに増減すると報ぜられている。火入れによって味が変わるのも、火入れ前の酸素の量に左右されるといわれており、還元剤を加えて火入れすると悪化が防げるという報告がある。とにかく、できるだけ空気に接触しないようにして、ORP を上げないように操作することが強調されている。この場合、単に rH だけではなくて、電位緩衝も考えに入れなければならない。緩衝容量がかなり大きな麦酒がよい訳である。それで Indicator Time Test (標準電位の高い色素を加え、これが還元される速度を測定)によって、この緩衝容量も含めて、麦酒の還元能が測られている。よく注意して操作した製品では ITT 値が100秒程度であるが、空気との接触が多かったものは1000秒以上である。電位緩衝物質はことに dark beer 中に多く含まれ、dark beer が rH 10 からそれほどずれずに酸素と結合する性質がしらべられた結果、この働きをするのは標準電位 9~10 の活性の形の糖で、乾燥操作中に麦芽中につくられ、また麦芽汁調製中にも生じ、これが酸素と結合して酵母に対する酸素給源になると報ぜられている⁽⁵⁷⁾。もっともこれが多すぎるとシスチン、グルタチオン、レダクトンの沈澱を起すという。

日本酒についても、近年本誌に報ぜられた⁽²⁾ように、醗酵や製品の管理に ORP を使おうと試みられている。大体の傾向としては、合成酒の ORP は高く rH 18.5~21.0、清酒はこれより低く、新酒では火入れ前には 11.0~13.5、火入れ後6~9ヶ月たつと 15.5~17.0 に上がっている。合成酒製造には米として5%に相当するまでの酢、醪、清酒など(香味液という)を混和することが許可されているが、これを加えた後で香味が変わって悪くなることがある。この管理に ORP が使える。つまり、ORP の高い合成酒に ORP の低い香味液を比較的少量混和すると、ORP の急な変化を来し、これが香味の変化や悪化と並行している。それで、ORP 変化が起らないように、よく熟成させて古酒にしてから混和するか、新しい香味液をませても ORP の急な変化が起きないように工夫すれば、この変香味は防止される。

酒精醗酵についても ORP が高いと酵母のアルコール生成能が弱くアルコール収量が下がるという報文がある⁽⁵⁸⁾。過マンガン酸カリでアルコールを精製する際も、ORP が変る状態を検して適条件が示されている⁽⁵⁾。

醗酵とはいえないが、紅茶製造でも ORP を用いて酸化過程での各成分の機能が検せられている⁽⁵⁹⁾。

抗生物質についても、その効果を病原菌培養の ORP 曲線の型で検しようとする試みがなされている。曲線の型は使用抗生物質の特性を示し、細胞計測より更に直接的な知見が得られると報ぜられている⁽⁶⁰⁾。その外、ペニシリンの抗菌性作用が methylene blue を添加すると増加され、それより標準電位が高いか低い色素の添加によって抑制されることが示され、ペニシリンの効果と ORP との間に関連があると報ぜられている⁽⁶¹⁾。

その他殺菌剤についても、低 ORP が呈する殺菌効果が論ぜられ⁽⁶²⁾、塩素あるいは塩素含有物の殺菌効果と電位効果とが平行すると指摘されている⁽⁶³⁾。

10. む す び

以上ごく概略的に酸酵に関係のある ORP 的研究を俯瞰したが、この方面での研究は確かにいまなお途上にある。しかし、酸酵では酸化還元が主役を果しているのであるから、その機構を解明しエネルギー代謝を探る方法として ORP 的な考え方は有効であろうし、また分析的に進んできて得られたいろいろな素材を組み立てて現象を総合的にみて行くのに有効であろうと考えられる。もっとも、生細胞のような複雑な系にこのような考えを単純に不用意におしこむことはよく注意しなければならないことは勿論である。しかし、その方向への努力は払わなければならない。応用方面にしても、今までのものの外に種々な方面に様々な使い方が考えられる。諸賢の関心と研究を期待する次第である。

- (31) K. G. Paul : *Archiv. Biochem.*, 12, 441 (1947), F. L. Rodkey, E. G. Ball : *Federation Proc.*, 6, 286 (1947).
- (32) S. F. Velick, P. Strittmatter : *J. Biol. Chem.*, 221, 265 (1956).
- (33) K. Burton, T. H. Wilson : *Biochem. J.*, 54, 86 (1953), F. L. Rodkey : *J. Biol. Chem.*, 213, 777 (1955).
- (34) B. Mackler, H. R. Hahler, D. E. Green : *J. Biol. Chem.*, 210, 149 (1954).
- (35) H. M. Kalckar : *Chem. Rev.*, 28, 71 (1941).
- (36) M. Hietaranta : *C. A.*, 42, 3455 (1948) (*Snomen Kemistilchti*, 20B, 39 (1947)).
- (37) M. V. Fedorov : *C. A.*, 48, 6504 (1954) (*Doklady Akad. Nauk (USSR)* 72, 1139 (1950)).
- (38) J. Seeger, P. Manil : *Compt. rend. soc. biol.*, 149, 2021 (1955).
- (39) O. Hoffmann-Ostenhof, E. Kriz : *Arch. Biochem.*, 24, 459 (1949).
- (40) E. J. Conway, R. P. Kernan : *Biochem. J.*, 61, 32 (1955).
- (41) 山田 晃 : 大坂医会, 42, 1820 (1943).
- (42) E. D. Mikhlin, M. G. Golysheva : *C. A.*, 49, 2561 (1955) (*Biokhimiya*, 19, 549 (1954)).
- (43) A. R. Prevot, J. Taffanel : *C. A.*, 42, 251 (1948).
- (44) 本江元吉 : 本誌, 31, 731, 735, 816 (1957).
- (45) L. P. Hager, D. M. Geller, F. Lipmann : *Federation Proc.*, 13, 734 (1954).
- (46) M. M. Weber, N. O. Kaplan : *Bact. Proc.*, 96 (1954).
- (47) A. F. Langlykke, J. M. van Lanen, D. R. Fraser : *Ind. Eng. Chem.*, 20, 1716 (1948).
- (48) H. de Almeida : *C. A.*, 48, 7843 (1954) (*Anais inst. Virho Porto* No. 13, 85 (1952)).
- (49) V. A. Berg : *C. A.*, 49, 9869 (1955) (*Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR* 13, No. 8, 13 (1953)).
- (50) M. A. Joslyn : *Ind. Eng. Chem.*, 41, 587 (1949).
- (51) G. Cerutti : *C. A.*, 50, 14174 (1956) (*Alimentaz.*, 6, 5 (1956)).
- (52) N. P. Krasinskii, E. A. Pryakhina : *C. A.*, 41, 1808 (1947) (USSR Pat. 65,782 (1946)).
- (53) N. P. Krasinskii, E. A. Pryakhina : *C. A.*, 41, 3255 (1947) (*Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR*, 6, No. 2, 7 (1946)).
- (54) L. Deibner : *C. A.*, 51, 10833 (1957) (*Ann. inst. natl. recherche agron. Sér. E* 5, 399 (1956)).
- (55) E. J. Jeffery : *Brewing Theory and Practice*, W. Kleber : *Brauwissenschaft* 69 (1948), *C. A.*, 44, 3205 (1950).
- (56) F. Weinfurter, A. Uhl, R. Pöhlmann : *Brauwissenschaft*, 166, 192 (1955), *C. A.*, 50, 11606 (1956).
- (57) M. Loncin : *Wochschr. Brau.*, 60, 47, 51 (1943), *C. A.*, 39, 150 (1945).
- (58) A. M. Malkov, V. E. Deeva, O. I. Kryachkova : *C. A.*, 50, 11603 (1956). (*Trudy Leningrad. Tekhnol. Inst. Pishchevoi Prom.* 3, 103 (1953)).
- (59) E. A. H. Roberts : *Chem. and Ind.* 1354 (1957).
- (60) A. Krámlí, J. K. Stur, P. Turay : *C. A.*, 49, 3302 (1955) (*Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 5, 549 (1954), 9, 83 (1956)).
- (61) G. Simkovic, S. Korossy : *C. A.*, 42, 8868 (1948) (*Orvosok Lapja Népegészségügy*, 3, 1377 (1947)).
- (62) A. Seppilli, P. Zamboni : *C. A.*, 44, 7934 (1950) (*Bull. soc. med. chir. Modena*, 48, 3 (1948)).
- (63) M. N. Trakhtman : *C. A.*, 44, 3564 (1950) (*Gigiena i Sanit.* No. 2, 13 (1949)).