[農化 第 42 巻, 第 3 号, p. 139~145, 1968]

乳酸逐次添加通気培養による清酒酵母 cytochrome c 含量の増加 (その 1)

上野 進, 角野一成, 谷 喜雄, 福井三郎
(京都大学工学部工業化学教室)

昭和 42 年 7 月 12 日 受 理

Increase of Cytochrome c Content of *Saccharomyces sake* in Aerobic Cultivation under Successive Addition of Lactic Acid

By Susumu UENO, Kazushige SUMINO, Yoshio TANI and Saburo FUKUI
*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Kyoto University, Yoshida, Kyoto*

In a previous paper the authors reported that cytochrome c content of the cells of *Saccharomyces sake* was significantly enhanced by cultivating in a glucose-medium containing lactic acid under vigorous aeration.

This paper deals with a fundamental study on the production of cytochrome c based on the phenomenon mentioned above. A time-course study revealed that successive utilizations of glucose and lactic acid resulted in Monod's "diauxie type" growth of the yeast and the cytochrome c content increased temporarily at the early to middle stages of both the logarithmic phases. Maintenance of the high cytochrome level in the yeast cells was achieved by successive addition of lactic acid to the culture broth.

(Received July 12, 1967)

パン酵母を嫌気培養した場合には mitochondria の形成はほとんど認められず呼吸系酵素類の活性も弱い, これを好気条件に移すと mitochondria が形成され呼吸系酵素類の活性が強くなる. また cytochrome 類の含量および種類も嫌気増殖時と好気増殖時には著しい差が認められる.

これらの事実は Slonimskii 一派^(1,2)をはじめ, Bartley ら⁽³⁾, Lindenmayer-Smith ら⁽⁴⁾ 多くの研究者^(5,6) によって観察されている. 著者らはさきに清酒酵母を乳酸含有培地に静置培養すると, 酵母細胞は "unbalanced growth" をおこし, その際の cytochrome c 量も検出されないほど微量であるが, 振盪培養および通気培養のごとき好気条件下では, 逆に乳酸が利用されて cytochrome c をはじめ FAD, NAD および CoA などが著しく増加することを報告した⁽⁷⁾.

本報では炭素源としてブドウ糖, 乳酸を併用した培地において清酒酵母をはじめとする数種の酵母の cytochrome c (以下 Cyt. c と略す) 生成を検討した結果,

清酒酵母などではブドウ糖が消費されたのち, 乳酸が利用されることにより増殖曲線は Monod⁽⁸⁾ の "Diauxie" 型を示し, 乳酸利用による対数増殖期の初期から中期にかけて cytochrome 含量が急激に増加することを認めた.

このことを利用して, 酵母による Cyt. c の工業生産を行なうことを目的として, その基礎条件の検討を行なったので報告する.

実 験 方 法

I. 培地および培養法

実験に使用した培地は Table I のように, ブドウ糖, カザミノ酸, 各種無機塩およびビタミンを加えた Atkin-Schultz 培地⁽⁹⁾ に乳酸を 1.5% 添加したものを使用した. 培養はこの培地に 1×10^5 cells/ml の割合で酵母を接種して 220 rpm の回転式振盪機および 10 l 容の jar-fermentor により通気培養を行なった

II. Cyt. c の抽出および測定法

酵母菌体からの Cyt. c の抽出と定量法を Scheme 1

Table I. Composition of the Basal Medium Used.

(A) Basal medium

(Vitamin-free, double strength)

Component	Amount in 100 ml
Glucose	10 g
KH ₂ PO ₄	110 mg
KCl	85 mg
CaCl ₂ ·2 aq	25 mg
MgSO ₄ ·7 aq	25 mg
MnSO ₄	0.5 mg
FeCl ₃	0.5 mg
K-Citrate·1 aq	1 g
Citric acid·1 aq	0.2 g
Casamino acid	1 g

(B) Vitamins

Vitamin	μg per ml of the final medium
Thiamine-HCl	0.25
Riboflavin	0.1
Pyridoxine-HCl	1.0
Niacin	5.0
p-Aminobenzoic acid	0.5
Biotin	0.006
Inositol	25.0
Ca-Pantothenate	0.5

に一括して示した。すなわち大林法⁽¹⁰⁾に従い一定量の培養液から遠心分離し、洗滌した酵母菌体を pH 8.3 のリン酸 buffer に懸濁し、cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) を加えて 37°C で 4 時間放置し、抽出液に sodium hydrosulfite を加えて還元し、還元型の Cyt. c の特異吸収である 550 mμ のピークおよび 535 mμ の谷の吸光度の差より Cyt. c 量を算出する O. Rosenthal 法⁽¹¹⁾によった。

また抽出操作を行わず、菌体内の Cyt. c を直接島津製作所製のマルチパーパス分光光度計を用いてオパールグラス法⁽¹²⁾を一部改良した方法で検出、測定した。実験結果の部に述べるように、後者では前者の約 3 倍の値が得られたが、両法の定量値の傾向は同一であるので、主に前者を用い、後者による値と適宜比較した。

結果および考察

1. 菌種の検討

清酒酵母 (協会 7 号), パン酵母および

Scheme 1. Assay Procedure of Cytochrome c Formed in the Cells of *Saccharomyces sake*.

Rosenthal's calculation

Content of Cyt. c (mole/ml)

$$= \frac{D_{550} - D_{535}}{E_{550} - E_{535}} \times \frac{1}{l} = X$$

Content of Cyt. c (μg/ml) = 600 × (D₅₅₀ - D₅₃₅)D₅₅₀ = Optical density observed at 550 mμD₅₃₅ = Optical density observed at 535 mμE₅₅₀ = 2.77 × 10⁷ E₅₃₅ = 0.77 × 10⁷

l = 1 cm

Candida albicans の 3 種の酵母を乳酸添加, 無添加の両培地でそれぞれ振盪培養し, それぞれの増殖量, Cyt. c 含量の経時変化をみた。

Fig. 1 に示すように, 菌株により乳酸の添加効果は異なり, 乳酸無添加培地では増殖量, Cyt. c 含量ともに 3 菌種ともほぼ同等の値を示したのに対して, 乳酸添加培地では清酒酵母, パン酵母の菌体増殖量, Cyt. c 含

Fig. 1. Effect of Lactic Acid on Cytochrome c Formation of Various Kinds of Yeast.

Cultivation was carried out on a rotary shaker (220 rpm) at 30°C.

● : *Candida albicans* ○ : *Sacch. sake* (No. 7)
 △ : Baker's yeast

量が無添加増地よりすぐれているのに反し, *Candida albicans* では乳酸をほとんど利用せず, 菌体増殖量, Cyt. c 含量とも他の 2 種に比べて著しく小さな値を示した。

清酒酵母およびパン酵母の菌体増殖量は, 培養初期では乳酸添加により培地の pH が低いため無添加のものより低い値を示したが, 培養が進むにつれて培地中の乳酸が利用され, pH が上昇し乳酸無添加のものよりも高い値を示した。

培養液 1 l 当りの Cyt. c 含量は乳酸無添加増地では 1~2 mg であったのに対し, 乳酸添加増地では 3~4 mg の高い値が得られた。単位菌体当りの Cyt. c 含量は無添加増地では 0.1~0.2 mg/g-dry cell であり, 乳酸添加増地では 0.4~0.6 mg/g-cell であった。

2. 増地成分の検討

酵母菌体内には Cyt. c などの heme (heme および hematin), protoporphyrin IX などのほかに少量の coproporphyrin I および III が含まれていることが知られている。

Stick-Eisgrober⁽¹³⁾ は *Sacch. ananensis* における coproporphyrin, heme の生成割合に及ぼすビタミンの効果調べて, nicotinamide とビタミン B₂ は coproporphyrin の生成を抑制し, とくに B₂ と Fe²⁺ イオンの共存により heme 量は 5 倍になり, coproporphyrin は検出できなくなることを認めている。また逆に, パントテン酸は coproporphyrin 量を増加させ, B₁, B₂, nicotinamide, パントテン酸および B₆ の共存は heme 量を減少させることを認めている。

このように, 培地中に添加するビタミンの種類や量により Cyt. c の生成量が変化するのはないかと考えて, 乳酸添加の合成増地からそれぞれ B₁, B₂, B₆ および niacin を欠除した増地, パントテン酸添加量の異なる増地および Fe²⁺ や Fe³⁺ イオンの量を変化させた増地を用いて清酒酵母の増殖量および Cyt. c 含量を検討した。

その結果, 本実験条件では, Fe イオン量またはパントテン酸量の少ない増地では増殖がおくれて, 菌体量が他のものに比べて小さな値を示したが, 他の B₁, B₂, B₆

Fig. 2. Growth and Cytochrome c Formation of *Sacch. sake* when Lactic Acid was added from the Beginning of the Cultivation. The cultivation was performed in a 10-liter jar-fermentor at 30°C.

および niacin の欠除増地はいずれも完全合成増地とほとんど変わりなく, Cyt. c 含量にも相違は認められなかった。

したがって, 以後の実験では増地は Table I の組成のものを使用した。

3. Jar-fermentor による培養

3-1. 当初から乳酸を添加して培養した場合: 振盪培養で得られた上述の結果を通気培養に適用するため, つぎに乳酸 1.5% 添加合成増地を用いて 10 l 容の jar-fermentor により攪拌羽根の回転数 400 rpm, 毎分液量の 1.5 倍量の通気量で清酒酵母を培養し, 菌体量, Cyt. c 量および糖, 乳酸の濃度を経時的に測定した。

酵母の増殖は培養開始後 20 時間目頃からはじまり, ブドウ糖のみを基質として増殖し, 糖消費後はじめて乳酸を利用するようになる。したがって, この際の増殖曲線は 2 段となり, Monod⁽⁸⁾ の "Diauxie" 型を示した (Fig. 2)。

Cyt. c 含量は第 1 段の糖利用の対数増殖期でいったん増加し, 定常期に入ると低下するが次の乳酸利用の対数増殖期ではさらに著しく増加し, 2 段目の定常期に入ると再び低下した。

このように, Cyt. c 含量の消長は増殖曲線と同様な形となって, Cyt. c 含量は第 1 段目の対数増殖期では菌体 1 g 当り 0.5 mg であったが, 乳酸が利用されるようになると約 1.0 mg に増加した。

Fig. 3. Growth and Cytochrome c Formation when Lactic Acid was added after Consumption of Glucose.
Cultural conditions were similar to those of Fig. 2.

3-2. 培養中期に乳酸を添加した場合： 前述のように当初から乳酸を添加して培養した場合、培地中の乳酸のために培地の pH が 3 付近となり、酵母の至適 pH よりもかなり低下して乳酸無添加時と比べて菌体の増殖開始時期が相当おくれた。このような乳酸による増殖のおくれを除くために、まず乳酸無添加培地で培養し、対数増殖期を過ぎて糖がほとんど消費されてしまったから乳酸を添加してみた。

この方法では lag phase が約 10 時間短縮され、第 1 段目の菌体収量もかなり多くなった。ブドウ糖消費後の定常期に乳酸を添加すると再び増殖した。また Cyt. c 含量も Fig. 2 と同様な曲線となった (Fig. 3)。

乳酸を途中添加して培養を行なうと単位菌体当りの Cyt. c 量は変わらないが、菌体収量が多くなるために単位培地当りの Cyt. c 含量も多くなった。

このように乳酸を培地に添加して培養を行なうと、乳酸が利用されて酵母の菌体収量および単位菌体当りの Cyt. c 含量が多くなった。このため全生成量はかなり増加していると考えられ、工業的にも有利であると思われる。

しかし菌体の対数増殖期をすぎると直ちに減少する一過性であるため、Cyt. c 量の多い状態で菌体を採取するような時期を選択するのが

困難である。このことから Cyt. c 含量を高い状態で維持することが必要になってくる。

3-3. 乳酸を間欠的に添加した場合： そこで Cyt. c 含量を高い状態で維持するために、酵母増殖により消費された培地中の乳酸を逐次適当な時期に補足して、できるだけ乳酸濃度が 0.1 から 0.5% 程度に保つようにすると Fig. 4 に示すように、単位菌体当りの Cyt. c 含量は多少の変動の幅を上下しながら高

い値が保たれることが認められた。

4. マルチパーパス分光光度計による完全菌体中の cytochrome 類の消長の検討

以上のように、乳酸添加による Cyt. c 含量の増加が認められたが、ここまでの Cyt. c 量の定量には Scheme 1 のように CTAB による抽出法を使用したので実際は菌体中の Cyt. c 量には差がなくても乳酸が消費される

Fig. 4. Effect of Successive Addition of Lactic Acid on Cytochrome Formation.

Cultural conditions were the same as those of Fig. 2.

Fig. 5. Absorption Spectra of Cytochrome c as Contained in Intact Cells.

Measurement was carried out by opal-glass method using Shimadzu-multipurpose Spectrophotometer.

Shaking culture

Lactic acid 1.5% —, 0% ----

Statical culture

Lactic acid 1.5% & 0% - - -

Fig. 6. Effect of Lactic Acid on the Growth and Cytochrome c Formation in Shaking Cultivation.

The amount of cytochrome c content was assayed by opal-glass method.

ことにより、菌体中の Cyt. c が抽出されやすくなった結果、Cyt. c 測定値が増加しているということも考えられる。

このことを検討するために島津製マルチパーパス分光光度計を用いて菌体中の Cyt. c をそのまま検出した。

Fig. 5 は乳酸 1.5% 添加培地で、3 日間静置培養および振盪培養した酵母の吸収帯を比較したものであるが、これによると、静置培養した酵母では乳酸添加、無添加にかかわらず Cyt. c の特徴的な吸収である 550 mμ 付近のピークはほとんど見られず、420 mμ 付近の Soret 帯が認められた。一方、振盪培養酵母では 550 mμ にはっきりした極大吸収を示し、菌体 1 g 当り 2 mg の Cyt. c 量に相当する山を示した。乳酸 1.5% 添加した培地では約 3.5 mg に相当する山を示した。また 560, 600 mμ 付近の shoulder は、それぞれ Cyt. b₂, a であると考えられるが詳しくは今後検討する予定である。

Fig. 6 は乳酸添加、無添加の両培地に清酒酵母を振盪培養し、その際の菌体量、Cyt. c 含量の経時変化をマルチパーパス分光光度計を使用して追跡したものである。

これによれば、今までの結果と同様に、乳酸を添加することによりはじめは増殖がおくれ、菌体量、Cyt. c 量ともに乳酸無添加のものと比較してかなり小さい値であったが、その後乳酸が利用されはじめると増殖は急激に増大して無添加のものが定常期に達する頃には菌体量、Cyt. c 含量ともに乳酸無添加のものより大きな値を示

Fig. 7. Spectra of Cytochrome c Formed in the Cells of *Sacch.sake* under the Experimental Conditions.

- In intact cell
- CTAB-extract
- - - Purified extract (reduced)
- · - Purified extract (oxidized)

した。このことから乳酸添加培養を行なうことにより、実際に Cyt. c が増加することを知った。

また、CTAB 抽出法による Cyt. c 測定値と比較すると、マルチパーパス分光光度計での測定値は約 3 倍の値を示したことから、一応 CTAB で抽出されたのは全 Cyt. c 量の 30~40% であったと考えられる (Fig. 7)。

なお、上述の実験で認められた CTAB 抽出液のピーク、およびマルチパーパス分光光度計により得られた完全菌体にみられたピークが、はたして Cyt. c のものであるかどうかを確かめるために、酵母の抽出液を Amberlite IRC 50 により精製して得られた Cyt. c のスペクトルが全菌体および抽出液のピークと同じ位置にピークを示したこと (続報に述べる)、精製した抽出液にアセトン-塩酸溶液を加え、生じた沈澱がエーテルに不溶であること、および精製抽出液からタンパク質を除いた heme にアルカリ中でビリジンを作用させて得た pyridine ferrohemochrome の位置から Cyt. c であることを確認

した。

以上の結果からも明らかなように、清酒酵母およびパン酵母においても乳酸はブドウ糖と比較して利用されにくく、同時に両者が共存している場合にはブドウ糖がはじめに消費されて、糖消費後はじめて乳酸が利用され、乳酸利用による対数増殖期の前半に Cyt. c 量の顕著な増大が認められた。この事実を乳酸を炭素源とした培地で酵母を好氣的に培養することにより、酵母 mitochondria の形成に好結果を与えるという知見と関連させて考えると、乳酸により Cyt. c 量が増大するのは乳酸が菌体に取りこまれて、L- および D-lactate-cytochrome c oxidoreductase (EC 1.1.2.3, 1.1.2.4) により、乳酸が酸化され利用されるための反応に関与する酵素系が一過的に増強されるためであろうと推定される。

要 約

(1) 清酒酵母を乳酸を添加した培地で好気培養すると、Cyt. c などが増加する現象を利用して Cyt. c 生産の増加のための基礎条件を検討した。

(2) 数種の酵母を合成培地で振盪培養または Jar-fermentor により通気培養し、培養経過および Cyt. c 量の消長を追跡した。Cyt. c 量の測定は CTAB による抽出法またはマルチパーパス分光光度計を用いるオパールグラス法を改良した方法で、完全菌体中の Cyt. c をそのまま測定した。

(3) 酵母菌体の Cyt. c 含量に及ぼす乳酸の作用は菌種により異なり、清酒酵母にたいしてとくに有効であった。

(4) 乳酸添加培地で清酒酵母を jar-fermentor で通気培養した場合、増殖曲線は 2 段となり、Cyt. c 量は糖利用の対数期でいったん増加し、次の乳酸利用の対数期でさらに急激に増加し、ついで減少した。

(5) 培地中に乳酸を逐次添加して培地内の乳酸濃度を一定に保つことにより、Cyt. c 量は高い値を維持することが可能であった。

(6) 本実験で採用した Cyt. c の定量法による吸収物質が真の Cyt. c であることを確認した。

本研究の要約は昭和 41 年度日本化学会年会および日本醸酵工学会で発表した。

なお、Cyt. c の精製、性質などに関して御教示と御援助をたまわった京都大学医学部公衆衛生学教室佐野晴洋助教授に深謝する。

-
- (1) P. P. Slonimski : "La formation des enzymes respiratoires chez la levure", Masson Cie, Paris (1953).
- (2) B. Ephrussi, P. P. Slonimski and G. Perrodin : *Biochim. Biophys. Acta*, **6**, 256 (1950).
- (3) E. S. Polakis, W. Bartley and G. A. Meek : *Biochem. J.*, **90**, 369 (1964).
- (4) A. Lindenmeyer and L. Smith : *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 445 (1964).
- (5) 長尾美奈子, 杉村 隆 : 化学と生物, **4**, 527 (1966).
- (6) W. C. Schneider and E. L. Kuff : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **54**, 1650 (1965).
- (7) 谷 喜雄, 角野一成, 下出光男, 山城敬一, 福井三郎 : 醸工, **43**, 642 (1965).
- (8) J. Monod : *Ann. Rev. of Microbiol.*, **3**, 371 (1949).
- (9) L. Atkin, W. L. Williams, A. S. Schultz and C. N. Frey : *Ind. Eng. Chem., Ann. Ed.*, **16**, 67 (1944).
- (10) 大林 晃 : 農化, **37**, 265 (1963).
- (11) O. Rosenthal : *J. Biol. Chem.*, **148**, 431 (1943).
- (12) K. Shibata : "Method of Biochem. Analysis", Vol. VII, Interscience Pub., New York, 1959, p. 77.
- (13) W. Stich and H. Eisgrober : *Z. Physiol. Chem.*, **287**, 19 (1951).
-