乳酸菌による酵母の凝集現象に関する研究 (第 3 報)

凝集におよぼす諸条件の影響

百瀬洋夫, 岩野君夫, 外池良三

(国税庁醸造試験所)

昭和 43 年 8 月 15 日 受理

Studies on the Aggregation of Yeasts Caused by Lactobacilli Part III. Effects of Various Conditions on the Aggregation

by Hiroo MOMOSE, Kimio IWANO and Ryôzô TONOIKE

Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency

The aggregation of yeasts caused by lactobacilli was observed at pH between 2 and 4, and it was reversible with respect to the change of pH. The optimum pH of the aggregation was about 3.2. Neither an outer layer substance of the cell wall nor calcium ion, which has been considered to be related to the flocculation of some kinds of yeasts, was related to the aggregation. The aggregation was prevented by treating the cells with cationic surface active agent (CTAB), uranyl nitrate, or neutral salts ($10^{-2}M$), but not with an anionic surface active agents (SLS).

From these results, it was supposed that the aggregation of yeasts caused by lactobacilli was due to the electrostatic force between yeast and bacterial cell surface.

(Received August 15, 1968)

緒 言

ある種の乳酸菌が酵母を凝集させる性質を持っていることは古く W. Henneberg⁽¹⁾ によって見出され, このような乳酸菌に対して *Flockenmilchsäurebakterien* の名が与えられた. その後, 遊佐ら⁽²⁾ はパン酵母を凝集させる乳酸菌 3 株を分離し, これらの乳酸菌は酵母を凝集させることから新種であろうと述べている.

著者らは前報⁽³⁾において *Lactobacillus plantarum* および *Lactobacillus casei* に属する乳酸菌の, *Saccharomyces cerevisiae* に属する各種酵母の凝集におよぼす影響について調べ, *L. plantarum* に属する乳酸菌は清酒酵母を凝集させるが, パン酵母, ブドウ酒酵母, アルコール酵母, ビール酵母は凝集させず, 一方, *L. casei* に属する乳酸菌はこれとは全く逆に, 清酒酵母は凝集させないがその他の酵母は凝集させることを見出した.

本報では乳酸菌による酵母の凝集機構を解明するため, 凝集する組み合わせの一つである *L. plantarum* に属する乳酸菌と清酒酵母協会 7 号について, 凝集におよぼす諸

条件を検討し, 乳酸菌による酵母の凝集機構について若干の知見を得たので報告する.

実験方法

供試菌: 乳酸菌は腐造清酒もろみより分離して *Lactobacillus plantarum* と同定した B-74⁽⁴⁾ を用いた. 酵母は清酒酵母協会 7 号を用いた.

培地および培養条件: 乳酸菌は麴汁 (Bllg. 5)-ポリペプトン (1%), pH 6.5, 酵母は麴汁 (Bllg. 5), pH 6.5 を用いて 30°C 3 日間静置培養した.

凝集率の測定: 蒸留水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母菌体をそれぞれ $5 \times 10^8/ml$, $5 \times 10^7/ml$ となるように蒸留水に懸濁した. 乳酸菌および酵母の菌体懸濁液を 5 ml ずつ混合して稀塩酸を用いて pH 3.2 とし, 5 分間攪拌した後 10 mm セルに入れて静置した. 30 分後に 660 m μ で OD 値を測定し, 次式によって得られる値を便宜上凝集率と呼ぶことにした.

$$\text{凝集率}(\%) = \{(A - B) / A\} \times 100$$

A: 混合直後の OD 値

B: 30 分静置後の OD₅₄₀ 値

実験結果

1. 凝集におよぼす pH の影響

蒸留水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母菌体につき、稀塩酸または稀カセイソーダを用いて菌体懸濁液の pH を調整し凝集率を測定した。

結果は第 1 図に示すとおりであり、凝集は pH 2~4 範囲でみられ、最適 pH は 3.2 であった。また、この凝集は pH 変化に可逆的にみられた。

第 1 図 乳酸菌による酵母の凝集におよぼす pH の影響

2. 凝集におよぼす菌体洗浄の影響

M. Kijima⁽⁵⁾ は酵母の凝集では 0.05 N カセイソーダ処理により取り除くことのできる外層物質が関係していることを報告している。また秋山⁽⁶⁾は泡なし酵母以外の清酒酵母は蒸留水の洗浄で容易に取り除くことのできる外層物質を持っていることを報告している。清酒酵母と呼ぶことのできる一群の酵母中、泡なし酵母のみがいずれの乳酸菌とも凝集しない⁽³⁾ことから、酵母の外層物質と凝集の関連性が考えられるので、この点を検討した。

酵母菌体を蒸留水で洗浄し、各洗浄回数ごとに蒸留水で 4 回洗浄した乳酸菌と混合し、凝集率を測定した結果は第 2 図に示すとおりであった。洗浄回数 4 回までは洗浄とともに凝集率が上昇し、以後一定となる。

また各種濃度のカセイソーダ溶液に酵母菌体を懸濁して 5 分間攪拌した後菌体を集め、さらに蒸留水で 3 回洗浄した後、乳酸菌と混合して凝集率を測定した結果は第 3 図に示すとおりであった。0.05 N カセイソーダ処

第 2 図 乳酸菌による酵母の凝集におよぼす酵母菌体洗浄の影響

第 3 図 各種濃度のアルカリで処理した酵母の乳酸菌による凝集

理では凝集率の低下はほとんどみられない。

以上の結果から乳酸菌による酵母の凝集には、酵母の外層物質は直接関係していないと考えられる。蒸留水で菌体を洗浄した場合、洗浄回数とともに凝集率が上昇しその後一定となることは、外層物質も含めて酵母の細胞表面に付着している物質は、むしろ凝集を妨げることを示すものである。

3. EDTA 処理と凝集

P. J. Mill⁽⁷⁾ は酵母の凝集は、 Ca^{2+} が酵母細胞表面の遊離カルボキシル基の間に塩橋を作って酵母菌体を結合するためみられる現象であると報告している。そこで Ca^{2+} 、 Mg^{2+} など塩橋を作る可能性のある金属イオンと凝集の関係を検討した。

蒸留水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母菌体を、それぞれ菌体濃度 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $5 \times 10^7/\text{ml}$ となる状態で 10^{-3}M EDTA で 2 回洗浄し、 10^{-3}M EDTA 溶液中で凝集率を

第 1 表 乳酸菌および酵母菌体の EDTA 処理の凝集におよぼす影響

処 理	凝集率(%)
EDTA 処理	80.5
無 処 理	86.0

測定した。結果は第 1 表に示すように、EDTA 処理による凝集の著しい阻害はみられず、乳酸菌による酵母の凝集には EDTA によって取り除かれる金属イオン

は関係していないといえる。

4. 凝集におよぼす界面活性剤の影響

陽イオン界面活性剤として cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)、陰イオン界面活性剤として sodium lauryl sulfate (SLS) を用いて、乳酸菌による酵母の凝集現象と細胞表面の遊離基の関係を検討した。

(1) CTAB 処理菌体の凝集：乳酸菌は $5 \times 10^8/\text{ml}$ 、酵母は $5 \times 10^7/\text{ml}$ の菌体濃度になるように、それぞれ 10^{-4}M 、 10^{-3}M CTAB 溶液に懸濁し、5 分間攪拌した後遠心分離により菌体を集め、蒸留水で 2 回洗浄したものを CTAB 処理菌体とした。

乳酸菌および酵母の CTAB 処理菌体および無処理菌体を組み合わせて凝集率を測定し、第 2 表に示す結果を得た。

第 2 表 乳酸菌および酵母菌体の CTAB 処理の凝集におよぼす影響

酵 母	乳酸菌	CTAB 処 理	無 処 理
CTAB 処 理		0*	0*
無 処 理		0*	84.4*

* 凝集率 (%)

第 3 表 CTAB 処理酵母菌体の SLS 処理による凝集率の回復

処 理	凝集率(%)
CTAB 処理後 SLS 処理	66.2
CTAB 処 理	0
無 処 理	82.6

また CTAB 処理酵母菌体を $5 \times 10^7/\text{ml}$ の菌体濃度で 10^{-3}M SLS 溶液に懸濁し、5 分間攪拌した後遠心分離により菌体を集め、蒸溜水で 2 回洗浄して界面活性剤無処理乳酸菌体との凝

集率を測定した。結果は第 3 表に示すとおりであり、凝集率の回復がみられた。

(2) SLS 処理菌体の凝集：乳酸菌および酵母をそれぞれ菌体濃度 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $5 \times 10^7/\text{ml}$ となるように 10^{-3}M SLS 溶液に懸濁し、5 分間攪拌した後遠心分離により菌体を集め、蒸溜水で 2 回洗浄して SLS₂ 処理菌体とした。

乳酸菌および酵母の SLS 処理菌体および無処理菌体を組み合わせて凝集率を測定した結果は第 4 表に示すと

第 4 表 乳酸菌および酵母菌体の SLS 処理の凝集におよぼす影響

酵 母	乳酸菌	SLS 処 理	無 処 理
SLS 処 理		76.3*	75.6*
無 処 理		77.4*	83.0*

* 凝集率 (%)

りであり、凝集率の著しい低下はみられなかった。 10^{-3}M SLS に乳酸菌および酵母を懸濁し、SLS 溶液中で凝集を調べた場合には、凝集は全く認められなかった。

以上、界面活性剤処理の結果から、乳酸菌による酵母の凝集には、乳酸菌および酵母の細胞表面の遊離基が関係しているといえる。

5. 凝集におよぼす中性塩の影響

中性塩として食塩を用いて凝集におよぼす濃度の影響を検討した。蒸溜水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母菌体を各種濃度の食塩水中で混合し、pH 3.2 として凝集率を測定した。結果は第 4 図に示すように、塩濃度が高くなるにつれ凝集率の低下がみられた。

第 4 図 乳酸菌による酵母の凝集におよぼす塩濃度の影響

6. 凝集におよぼす 1,2-epoxypropane 処理の影響

P. J. Mill⁽⁷⁾ は、1,2-epoxypropane で酵母菌体を処理

すると、カルボキシ基がエステル化されて酵母の凝集がみられなくなることを述べている。

第 5 表 乳酸菌および酵母菌体の 1,2-epoxypropane 処理の凝集におよぼす影響

処 理	凝 集 率 (%)
1,2-Epoxypropane 処 理	79.9
無 処 理	80.5

蒸溜水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母を、それぞれ菌体濃度 $5 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $5 \times 10^7/\text{ml}$ となるよ

うに 5% 1,2-epoxypropane 溶液に懸濁し, 30°C に 18 時間振とうした後, 遠心分離により菌体を集め, 蒸留水で 2 回洗浄して凝集率を測定した. 結果は第 5 表に示すように, 1,2-epoxypropane 処理による凝集率の低下はみられず, 凝集にはカルボキシル基は関係していないと考えられる.

7. 凝集におよぼす UO_2^{2+} 処理の影響

A. Rothstein⁽⁸⁾ は細胞表面のリン酸基に UO_2^{2+} が結合することを報告している. 蒸留水で 4 回洗浄した乳酸菌および酵母を, それぞれ菌体濃度 $5 \times 10^8/\text{ml}$, $5 \times 10^7/\text{ml}$ となるように 10^{-3}M 硝酸ウラニル溶液に懸濁し, 5 分間攪拌した後遠心分離により菌体を集め, 蒸留水で 2 回洗浄して凝集率を測定した. 結果は第 6 表に示すように, UO_2^{2+} 処理により凝集率の著しい低下がみられ, 凝集にはリン酸基が関係していると考えられる.

第 6 表 乳酸菌および酵母菌体の UO_2^{2+} 処理の凝集におよぼす影響

酵母	乳酸菌	UO_2^{2+} 処 理	無 処 理
UO_2^{2+} 処 理		3.3*	7.2*
無 処 理		11.4*	84.4

* 凝集率

考 察

乳酸菌による酵母の凝集は, 菌体を蒸留水で洗浄することにより著しくなり, 0.05N カセイソーダ溶液で洗浄しても凝集がみられることから, この凝集には酵母の外層物質および細胞表面に付着している種々の物質は関係がなく, 細胞壁の表面構造が関係していると考えられる. 0.5N 以上のカセイソーダ溶液で酵母細胞を処理すると凝集が著しく阻害されるのは, 細胞壁表面の性質が変わることによるものであろう.

乳酸菌および酵母菌体を陽イオン界面活性剤 (CTAB) で処理すると凝集が阻害され, この菌体をさらに陰イオン界面活性剤 (SLS) で処理すると凝集が回復すること, 硝酸ウラニルで処理した場合にも凝集が阻害されることから, 凝集には細胞表面の負の遊離基が関係していることがわかる. また SLS 溶液中では凝集がみられないことは, 細胞表面の正の遊離基も凝集に関係していることが考えられる. SLS の細胞表面の正の遊離基との結合は, CTAB の負の遊離基との結合に比べて弱く, 水洗により容易に取り除かれるため, 菌体を SLS 処理後水洗した場合に凝集が阻害されないものであろう.

乳酸菌による酵母の凝集には, 乳酸菌および酵母の細胞表面の遊離基が関係していると推定したが, この凝集は菌体を EDTA 処理し, カルシウムイオン, マグネシウムイオンなど多価金属イオンを除いた状態でもみられることから, P. J. Mill⁽⁷⁾ のような細胞表面の負の遊離基の間に金属イオンが入る結合ではない. この凝集は特定の pH 範囲 (pH 2~4) で, pH 変化に対して可逆的にみられ, 中性塩濃度を高くすることにより阻害されることなどから, この凝集は乳酸菌および酵母の細胞表面の遊離基の間に働く, 静電的な力によるものと推定できる.

乳酸菌および酵母の細胞表面の正の遊離基としてはアミノ基が考えられ, 負の遊離基としてはカルボキシル基, リン酸基が考えられる. 乳酸菌および酵母菌体を 1,2-epoxypropane 処理し, 遊離カルボキシル基をエステル化しても凝集の阻害は全くみられないことから, カルボキシル基はこの凝集に関係がないと考えられる. 低濃度の硝酸ウラニルで菌体を処理した場合にも凝集が著しく阻害されることは, 凝集にリン酸基が関係していることを示すものであろう.

乳酸菌による酵母の凝集が細胞表面の遊離基の間に働く静電的な力によるものであることは, 界面移動電気泳動法により, 乳酸菌および酵母の細胞表面の帯電状態と pH の関係を調べることにより, さらに明白にすることができたが, この点については続報で詳細を述べる.

要 約

乳酸菌による酵母の凝集は pH 2~4 の間で pH 変化に対して可逆的にみられ, 凝集の最適 pH は 3.2 である. この凝集には酵母の外層物質は関係がなく, また酵母の凝集で関係しているといわれているカルシウムイオンも必要としない. 陽イオン界面活性剤 (CTAB) 処理により凝集が阻害され, この菌体をさらに陰イオン界面活性剤 (SLS) で処理すると凝集が回復すること, 硝酸ウラニル処理により凝集が阻害されることから, この凝集には細胞表面の遊離基が関係していると考えられる. さらに中性塩濃度を高くすることにより凝集が阻害される. 以上のことから, 凝集は細胞表面の遊離基の間に働く, 静電的な力によるものと考えた.

本報の大意は昭和 43 年度日本農芸化学会大会で講演した.

-
- (1) W. Henneberg: "Handbuch der Gärungsbakteriologie", 1926, p. 247.
- (2) 遊佐 孝, 榎田静雄: イースト協議会技術懇談会発表報告記録, p. 55 (1951).
- (3) 百瀬洋夫, 岡崎直人, 外池良三: 醸協, **63**, 686 (1968).
- (4) 外池良三, 百瀬洋夫, 久富鉄也, 阿久津富郎: 醸協, **58**, 647 (1963).
- (5) M. Kijima: *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.*, **7**, 7 (1964).
- (6) 秋山裕一, 岩田知栄子: 醸工, **44**, 1 (1966).
- (7) P. J. Mill: *J. Gen. Microbiol.*, **35**, 61 (1964).
- (8) A. Rothstein: *Disc. Faraday Soc.*, **21**, 229 (1956).
-