Schizosaccharomyces pombe によるリンゴ酸の 分解について

岡 本 辰 夫*

Decomposition of L-Malic Acid by *Schizosaccharomyces Pombe*

TATSUO OKAMOTO

Schizosaccharomyces pombe (IFO 0358) having intrinsically high ability of decomposing L-malic acid, when cultured in a synthetic growth medium, showed weaker ability to decompose L-malic acid than the ability cultured in apple juice, and it suggests that apple juice contains an unidentified factor or factors to promote the L-malic acid decomposition by the yeast. So, experiments were made to determine the nitrogen and mineral sources required to decompose L-malic acid by the yeast, and it became clear that the appearance of the L-malic acid decomposing ability was mainly due to the presence of L-asparagine which was contained in apple juice, and, in fact, *Schizosaccharomyces pombe* cultured in the synthetic growth medium with L-asparagine as a sole source of nitrogen, replacing ammonium salt, showed high ability to decompose L-malic acid.

Furthermore, experiments were made to determine the effects of nutritional materials—vitamins, mineral salts, nitrogenous compounds—on the formation of malate dehydrogenase by *Schizosaccharomyces pombe*, which might control the L-malic acid decomposition, and this series of experiments showed that the presence of nicotinic acid, biotin, iron and L-asparagine was effective to promote the activity of malate dehydrogenase of the yeast.

(Received Jan. 10, 1972)

特殊な酵母によるリンゴ酸の分解についての研究は、1914年の KLUYVER の報告¹⁾以来数多く行なわれていく²⁾³⁾が、その酵母は *Schizosaccharomyces* に属するものが大部分であり、筆者らも *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0358 [以下 *S.p.* 0358 と略す] を主として用い、この酵母がリンゴ果汁中のリンゴ酸を急速に分解し、また、その分解は L-リンゴ酸→オキザロ酢酸→ピルビン酸 (および炭酸ガス)→アセトアルデヒド (および炭酸ガス)→エチルアルコールという機構により、

という収支で行なわれ、さらに、この酵母は L-リンゴ酸をオキザロ酢酸に変化させる NAD dependent なリンゴ酸脱水素酵素の強い活性を有することを認めた⁴⁾。今回は、*S.p.* 0358 の栄養要求とそのリンゴ酸分解との関係などについて報告する。

実験材料および方法

1. 酵 母

既報⁴⁾と同じく、*Schizosaccharomyces pombe* IFO 0358 を用いた。

2. 菌体量

光電分光光度計で 610 nm の吸光度の変化により測定した。0.5 mg/ml 以下の乾燥菌体量に対して、吸光度はほぼ直線関係がえられるので、この範囲内で測定した。

3. リンゴ酸の定性・定量

既報⁴⁾と同じく、定性はセルロース末薄層クロマトグラフィー (展開剤: 酢酸エチル: 酢酸: 水=3:1:1, 発色剤; 0.1% Brom Phenol Blue 溶液) により、定量はアルカリによる滴定およびイオン交換樹脂 (Dowex 1, ×8) によるカラムクロマトグラフィーによった。

* 弘前大学農学部園芸化学科 (青森県弘前市文京町 3)

Department of Horticultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hirosaki University, Hirosaki, Aomori.

4. アセトン処理菌体抽出液 (酵素液) の調製

酵母菌体を培養液から 3000 rpm, 10 分間遠心分離し, えられた菌体を蒸留水に分散し遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) をすることを 2 度行なう。えられた洗浄菌体に 20 倍量の -10°C アセトンを加え 2000 rpm, 10 分間遠心分離し沈澱した菌体にさきと同量の -10°C アセトンを加え, 再び 2000 rpm, 10 分間, 遠心分離し, 室温で減圧乾燥したものをアセトン処理菌体とした。この乾燥菌体に一定量の蒸留水を加え, 25°C で 30 分間抽出し, 2000 rpm で 5 分間遠心分離した上澄液 (アセトン処理菌体抽出液) を酵素液として用いた。

5. リンゴ酸脱水素酵素 (Malate dehydrogenase, L-Malate: NAD oxidoreductase) 活性

酵素反応液の組成は次のとおりである。0.1M トリス緩衝液 (pH 7.40) 1.0 ml, 酵素液 (アセトン処理菌体抽出液) 1.0 ml, (還元型) NAD [mg/ml] 溶液 0.5 ml, 0.05 M (オキサロ酢酸) L-リンゴ酸溶液 0.5 ml, 20°C で反応させ, 反応初期 1 分間の 340 nm の吸光度の変化 0.01 を 1 unit として表わした。

6. 酵素液の蛋白質定量

WADDELL 法⁹⁾によった。

実験結果および考察

1. 生育に対する各種ビタミンの影響

第 1 表に示す組成の培地を基本培地 A とし, これに各

種のビタミンを別個に添加し, 27°C における *S.p.* 0358 の生育を 610 nm の吸収で測定した。なお, ビタミン添加の影響は, 全ビタミン添加の生育量を 100 とし, それに対する比率 (%) で表示した。また, 添加ビタミンの種類と量とは常法⁹⁾によった。この結果, 第 2 表に示されるように, 基本培地 A に meso inositol, nicotinic acid, calcium pantothenate, biotin を加えたものが, 基本培地 A に全ビタミンを加えたものと大差ないことが明らかとなり, しかも, これはリンゴ果汁 (品種 [紅玉] より調製) 中での生育度より良好であった。このように, 基本培地 A に meso inositol, nicotinic acid, calcium pantothenate, biotin を加えたものは, *S.p.* 0358 の生育に対するほぼ完全な培地とみなしうる。そこで, これを基本培地 B とした (第 3 表)。

2. 栄養要求と減酸

以上のように, *S.p.* 0358 の生育に対する栄養条件はほぼ明らかとなったが, この基本培地 B に L-リンゴ酸を 0.3% 加えて (基本培地 C とする), 27°C での減酸

第 1 表 基本培地 A

glucose	5 %
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.3
KH_2PO_4	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
pH 3.0	

第 2 表 *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0358 の生育に対するビタミン添加*の影響

(27°C , 3 日間培養)

培 地	生育度**
基本培地 (B.M.A.)	3
B.M.A.+meso inositol	14
B.M.A.+meso inositol+nicotinic acid	36
B.M.A.+meso inositol+nicotinic acid+calcium pantothenate	63
B.M.A.+meso inositol+nicotinic acid+calcium pantothenate+biotin	98
" + " + " + " + " +riboflavin	96
" + " + " + " + " +p-aminobenzoic acid	88
" + " + " + " + " +thiamin HCl	74
" + " + " + " + " +folic acid	64
" + " + " + " + " +pyridoxine HCl	64
" + 全ビタミン	100
リンゴ果汁***	72

* ビタミン添加量は次のとおりである

(meso inositol 2000 $\mu\text{g/l}$, nicotinic acid 400 $\mu\text{g/l}$, calcium pantothenate 400 $\mu\text{g/l}$, pyridoxine HCl 400 $\mu\text{g/l}$, thiamin HCl 400 $\mu\text{g/l}$, p-aminobenzoic acid 200 $\mu\text{g/l}$, riboflavin 200 $\mu\text{g/l}$, folic acid 2 $\mu\text{g/l}$, biotin 2 $\mu\text{g/l}$)

** B.M.A.+全ビタミンの生育を 100 とした

*** 品種「紅玉」より調製

を調べた結果は第4表のとおりである。前述のように、菌体の生育は基本培地B、あるいは基本培地A+全ビタミン（基本培地Cもほぼ同様の生育度であった）の方がリンゴ果汁での生育よりかなり良好であるにもかかわらず、

第3表 基本培地B*

glucose	5 %
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.3%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
meso inositol	2000 µg/l
nicotinic acid	400 µg/l
calcium pantothenate	400 µg/l
biotin	2 µg/l

* 基本培地 B+0.3% L-malic acid を基本培地 C とする (pH 2.6)

第4表 基本培地および果汁での減酸率
(%, 27°C 培養)

培 地	培 養 日 数			
	0	2	4	6
基本培地C*	0	16.2	28.9	33.2
基本培地A**+全ビタミン	0	17.0	29.8	34.0
リンゴ果汁 (紅玉)	0	33.4	76.5	81.1

* 第3表参照

** 0.3% L-リンゴ酸を含む (pH 2.6)

第5表 減酸に対するリンゴ果汁添加の影響
(27°C, 4日間培養)

基本培地C: リンゴ果汁 (容量比)		減酸率 (%)
10	0	17.5
9	1	28.9
8	2	48.3
7	3	57.8
6	4	65.4
0	10	79.9

第6表 無機質添加の減酸に対する影響

(27°C, 4日間培養)

	C*	CMn**	CFe***	CCa****	CMnFe	CMnCa	CFeCa	CMnFeCa	リンゴ果汁
減酸率 (%)	21.6	26.4	33.8	15.9	32.4	13.8	32.1	32.6	76.4

* 基本培地C

** 基本培地C に Mn として 0.084 mg % となるように MnCl₂·4H₂O を添加

*** 基本培地C に Fe として 0.3 mg % となるように FeSO₄·7H₂O を添加

**** 基本培地C に Ca 7 mg % となるように CaCl₂·2H₂O を添加

ず、第4表から減酸の割合は果汁の場合より基本培地Cの方がかなり劣っていることが認められた。そこで、リンゴ果汁中には、この酵母による L-リンゴ酸の減少に対して促進効果を示す因子が存在することが予想される。そこで、この点を明らかにするため、基本培地Cとリンゴ果汁とを混合し、その混合比を変えたものを調製し、その場合の S.p. 0358 による減酸率を調べた結果は第5表に示すとおりである。その結果、リンゴ果汁の混合割合の大きいものほど、減酸率が大きいことが認められたので、前述の推定のように、リンゴ果汁中には L-リンゴ酸の減酸を促進する因子が存在することは確かである。

ところで、リンゴ果汁成分の分析値⁷⁾と基本培地Cの成分とを比較すると、無機成分ではとくに Mn, Fe, Ca の欠乏が基本培地Cにおいてみられる。そこで、基本培地Cにリンゴ果汁とほぼ等しくなるように Mn, Fe, Ca を加えて、それらの減酸に対する影響をみた (第6表)。その結果、とくに Fe がわずかに促進的效果を示すようであるが、果汁に比べてはかなり劣っていた。そこで、次に、窒素化合物の影響について検討を加えた。リンゴ果汁中には窒素として数十 mg % 含まれる程度であるが、その中でとくにアミド (L-asparagine が多い) やアミノ酸 (L-glutamic acid, L-aspartic acid が多い) が多く含まれるので⁷⁾、NH₄ 塩、L-asparagine, L-aspartic acid, または L-glutamic acid をそれぞれ基本培地C中の唯一の窒素源 (窒素として 0.0424%) として加えた場合の L-リンゴ酸の減少に対する影響を調べたところ、27°C で5日間培養した場合、吸光度による生成菌体量の測定値はほぼ等しいが、その減酸量は L-asparagine 添加の場合が 55.2% ともっとも大きく、次いで L-aspartic acid の 36.3%, L-glutamic acid の 32.8% とつづき、NH₄ 塩は 25.2% ともっとも劣っていた。そこで、さらに、もっとも著しい差のあった NH₄ 塩と L-asparagine とについて、L-リンゴ酸の減少を経時的に追った結果は第7表のとおりで、L-aspara-

gine は $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ に比べて L-リンゴ酸の分解にかなり有効に働くことが認められた。なお、他の有効成分についてはさらに検討を加える予定である。

3. リンゴ酸脱水素酵素活性

リンゴ果汁に培養した *S.p.* 0358 のアセトン処理菌体粉末からの抽出液には、たとえば *Saccharomyces oviformis* からのものに比べて、かなり強いリンゴ酸脱水素酵素活性がみられ、これが、*S.p.* 0358 が他の一般の酵母と異なっており、特異的に強力に L-リンゴ酸を減少させる原因であると認め⁴⁾が、この酵素の活性の増大と栄養物質との関係を調べるため、基本培地 A に、順次、生育に必要なビタミンなどを加えて行った場合の、酵素活性に対する影響を調べてみた。その結果、まず、第 8 表にみられるように、meso inositol, nicotinic acid,

biotin は促進的に働くが、calcium pantothenate はやや抑制的に働くことが認められた。さらに、鉄塩も促進的に働き (第 9 表)、窒素源として L-asparagine の促進的效果も認められた (第 10 表)。このように、各種の栄養物質が *S.p.* 0358 のリンゴ酸脱水素酵素活性の発現に貢献していることが認められたが、その効果の詳細については、今後検討する予定である。

要 約

L-リンゴ酸の分解力が強いと認められる *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0358 の生育に必要な栄養素について検討した結果、生育用基本合成培地として次のものが適当であると認められた。glucose 5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, meso inositol 2000 $\mu\text{g/l}$, nicotinic acid 400 $\mu\text{g/l}$, calcium pantothenate 400 $\mu\text{g/l}$, biotin 2 $\mu\text{g/l}$, pH 2.6, 必要に応じて L-リンゴ酸を 0.3% 添加。

次に、上記の生育基本合成培地では L-リンゴ酸の分解力が、リンゴ果汁中での分解力に比べると弱いので、L-リンゴ酸分解用の基本合成培地を検索したところ、とくに窒素源として、 NH_4 塩の代わりに L-asparagine を用いることにより、この菌の L-リンゴ酸分解力を強化させることが見出された。また、この菌の L-リンゴ酸分解力の主因となっていると認められるリンゴ酸脱

第 7 表 L-リンゴ酸の分解に対する窒素源の影響
(27°C 培養)

窒 素 源	培 養 日 数			
	0	3	4	5
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4^*$ (0.348%)	0	16.0	24.0	26.0
L-asparagine** (0.2%)	0	28.1	53.4	62.7

数値は L-リンゴ酸の分解率 (%) [カラムクロマトグラフィーで測定]

* 基本培地 C (N として 0.0424% 含有)

** 基本培地 C 中、窒素源のみを変えたもの (N として 0.0424% 含有)

第 8 表 基本培地 A にビタミンを加えて培養した場合のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性に対する影響

培 地 組 成	MDH 活性 (unit/mg 蛋白)
基本培地 A + meso inositol	0.220
基本培地 A + meso inositol + nicotinic acid	0.485
基本培地 A + meso inositol + calcium pantothenate	0.109
基本培地 A + meso inositol + nicotinic acid + calcium pantothenate	0.227
基本培地 A + meso inositol + nicotinic acid + calcium pantothenate + biotin	0.674

第 9 表 基本培地 C に鉄塩を加えた時のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性に対する影響
(27°C, 7 日間培養)

培 地	MDH 活性 (unit/mg 蛋白)
基本培地 C	0.620
基本培地 C + Fe*	0.694

* Fe として 0.3mg% となるように $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加

第 10 表 基本培地 C の窒素源を変えた時のリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性に対する影響
(27°C, 7 日間培養)

培 地	MDH 活性 (unit/mg 蛋白)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4^*$ (0.348%)	0.636
L-asparagine** (0.2%)	0.687

* 基本培地 C と同じ、ただし N として 0.0424% 添加

** 基本培地 C 中、窒素源のみを変えたもの、N として 0.0424% 添加

水素酵素活性におよぼすビタミン類，無機質，窒素化合物の影響についても検討を加えた。

本研究の概要は，1971年4月21日，日本食品工業学会第18回大会（東京）で報告した。

文 献

- 1) KLUYVER, A. J.: Biochemische Suikerbepalinger, Thesis, Delft (1914).
- 2) PAYNAUD, E., et al.: ARCHIV. FÜR MIKROBIOLOGIE, 48, 105 (1964).
- 3) RANKINE, B. C.: *J. Sci. Fd and Agric.*, 17, 312 (1966).
- 4) 岡本辰夫・原田順厚・小山内たか：弘前大学農学部学術報告, 17, 1 (1971).
- 5) WADDELL, W. J.: *J. Lab. Clin. Med.*, 48, 311 (1956).
- 6) 飯塚 広・後藤昭二：酵母の分類同定法（東京大学出版会），p. 61 (1969).
- 7) SMOCK, R. M. and NEUBERT, A. M.: Apples and Apple Products, (Interscience), p. 66, 68 (1950).
(1972年1月10日受理)