

酵母菌のアルコール発酵におけるリモネン及びその類似体の阻害作用

平成30年度 3年1組(36) 山口乃愛
指導 工学部応用化学科 太田英俊

はじめに

柑橘類の皮に含まれる**リモネン**にはD体とL体の二種類が存在し、酵母菌のアルコール発酵を阻害する作用がある。しかしながら、その阻害機構の詳細は未だ解明されていない。

目的

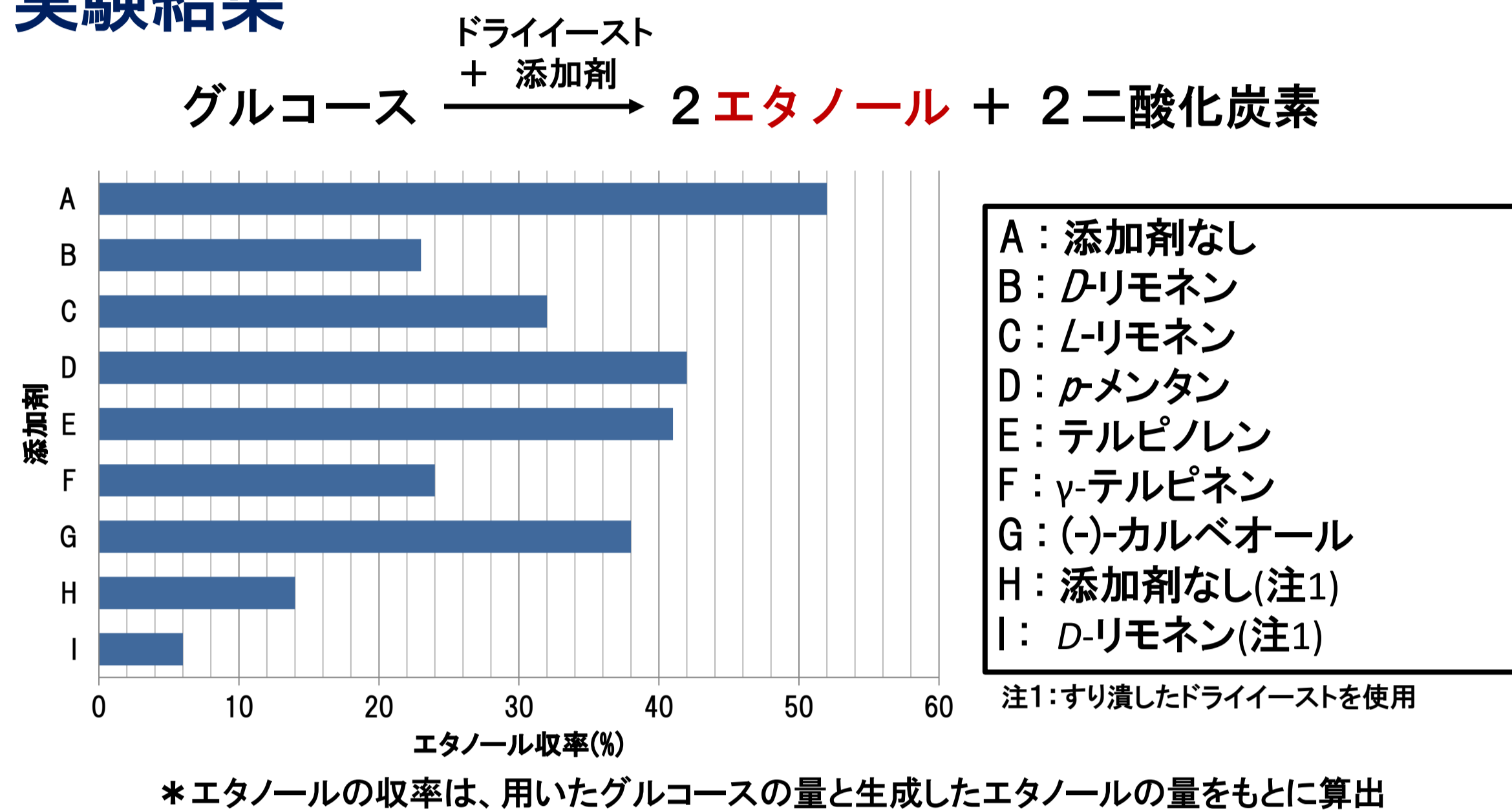
酵母のアルコール発酵に対する様々な添加剤の阻害活性を調査し、阻害機構に関する知見を得る。

- ◆ リモネンのD体とL体の阻害活性を比較する。
- ◆ リモネンと似た構造の添加剤の阻害活性を調べる。
- ◆ 酵母(ドライイースト)の前処理により、アルコール生成量が変化するかを調べる。

準備物・実験材料

- 三角フラスコ
- パスツールピペット
- 窒素入りゴム風船
- 駒込ピペット
- ねじ口試験管
- サンプル瓶
- 攪拌子
- 攪拌装置
- オイルバス
- ドライイースト
- グルコース
- 蒸留水
- エチレングリコールモノメチルエーテル
- **D-リモネン**
- **L-リモネン**
- **p-メンタン**
- **テルピノレン**
- **γ-テルピネン**
- **(-)-カルベオール**

実験結果



- ・ 添加剤を加えない場合、エタノールの収率は52%であった。
- ・ D-リモネンを添加すると、収率は23%に減少した。一方、L-リモネンでは収率は32%であった。
- ・ p-メンタン、テルピノレン、γ-テルピネン、(-)-カルベオールでもエタノールの収率が減少した。
- ・ すり潰したドライイーストを用いると、収率が著しく低くなった。


考察

- D-リモネンは、L-リモネンよりも阻害作用が強いことが判った。これは、リモネンと酵母の相互作用の強さが、D体とL体で異なることが原因と考えられる。
 - リモネンと似た構造を持つ化合物(p-メンタン、テルピノレン、γ-テルピネン、(-)-カルベオール)でも阻害効果があることが判った。添加物のわずかな構造の違いが、酵母との相互作用の強さに影響するためと考えられる。
 - 「添加剤なし(ドライイーストは含む)」と「すり潰したドライイースト」を比較すると収率に明確な違いが見られた。また、「すり潰したドライイースト&D-リモネン」は収率が一番低いという結果になった。これは、すり潰したことでドライイーストの細胞壁が破壊され、露出した細胞内部あるいは漏れ出した細胞抽出液が、空気や反応溶液に触れて死んでしまったためと考えられる。
- 以上の結果から、リモネンは酵母の生死の段階に関与することでアルコール発酵を阻害していることが示唆された。

結論

- ① 添加剤の構造の違いが、阻害活性に影響する。
- ② D-リモネンは、L-リモネンよりも阻害作用が大きい。(⇒ 酵母との相互作用の強さの違いが原因かもしれない)
- ③ ドライイーストをすり潰すと、エタノールの収率が著しく低くなる。(⇒ リモネンが酵母の生死に関与している可能性がある)

実験方法

- ① 蒸留水に窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を追い出した。
 - (1) 50 mL三角フラスコに蒸留水を約40 mL入れた。
 - (2) ゴム風船に窒素ガスを取り、先端にピペットを取り付けた。
 - (3) ピペットの先を(1)の蒸留水に浸し、窒素ガスを流通させた。
 - (4) (3)の蒸留水を別の50 mL三角フラスコに20 mL取り分けた。
- ② 添加物(10 mg)、ドライイースト(0.50 g)、攪拌子をねじ口試験管に入れた。サンプル瓶にグルコース(0.50 g)を量りとった。
- ③ 添加物、ドライイーストと蒸留水の懸濁液を調製した。
 
 - (1) 添加物とドライイーストが入ったねじ口試験管に蒸留水を10 mL加えた。
 - (2) 試験管を約40 °Cに調整したオイルバスにつけて5分ほど攪拌した。
- ④ グルコース水溶液を調製し、③に加えた。
 - (1) グルコースが入ったサンプル瓶に蒸留水7 mLを加え、水溶液にした。
 - (2) 攪拌した③の懸濁液に(1)の水溶液を加えた。
 - (3) サンプル瓶を蒸留水(計3 mL)で洗い、これを懸濁液に加えた。
- ⑤ エタノール生成量をガスクロマトグラフィーで分析した。
 - (1) 30分後に試験管をオイルバスから上げ、底をティッシュで拭いた。
 - (2) 氷水が入った浴槽につけて冷却した。
 - (3) 事前にサンプル瓶にエチレングリコールモノメチルエーテル(約0.20 g)を量っておき、これを蒸留水5 mLに溶かしてねじ口試験管に加え、攪拌した。
 - (4) 懸濁液を少量取り、綿栓ろ過した。得られた溶液をガスクロマトグラフィーで分析した。

*「すり潰したドライイースト」、「すり潰したドライイースト&D-リモネン」の実験は以下の⑥+上記①~⑤の手順で行った。

- ⑥ ドライイーストをすり潰した。
 - (1) 乳鉢にドライイーストを2~3g入れた。
 - (2) 乳鉢でドライイーストを10分間すり潰した。

今後の課題

今回の結果から、
(1) 阻害物質のわずかな構造の違いがエタノール生成量に影響すること
(2) リモネンは酵母の生死の段階に関与している可能性があることがわかった。
しかし、本実験の結果だけでは、その詳細まで知ることはできなかった。今後、(1)の理由を明らかにするには、阻害物質が作用する酵母の位置及び構造の特定が重要と考えている。
また、(2)を証明するために、ドライイーストの他の前処理方法の検討や、阻害機構として考えられる他の経路の洗い出しとモデル系の構築を行い、検証実験を積み重ねていきたい。

参考文献

1. 六訂版スクエア最新図説生物、第一学習社、2013年、松本 洋介監訳、64-65項
2. 改訂生物、東京書籍、2018年、浅島 誠ら監訳、58-59項

謝辞

この実験の準備・指導をして下さった愛媛大学工学部の太田英俊先生、課題研究のための授業や日程を考えて下さった牛島美月先生、本当にありがとうございました。