

論文の内容の要旨

論文題目 ビール麦由来の酵母早期凝集因子に関する研究

氏名 小泉 英樹

ビールや発泡酒のようなビール麦を原料とする酒類を製造する際、発酵工程中において早期凝集現象（早凝）と呼ばれる現象が観察されることがある。これは発酵後期に、酵母の資化可能な糖分がまだ麦汁中に残っているにもかかわらず、酵母が凝集して沈降してしまう現象のことをいう。酵母が凝集・沈降すると発酵の進行が停止し、規格外の酒類製品となり、大きな損害を蒙る。早凝は麦芽中の早凝因子と呼ばれる巨大な酸性多糖成分によって引き起こされると考えられていたが、因子の同定には至っていなかった。また早凝活性判定は、非常に手間と時間のかかる手法で行われていた。本研究では、まず早凝活性を既存の手法より高感度、かつ、簡便で短時間に判定できるアッセイ系を確立した。続いて、本アッセイ系を用いて、早凝因子を高度に精製し、構造的特徴を明らかにした。得られた成果の概要は以下の通りである。

1. 迅速かつ高感度な早凝活性判定法の開発

正常及び早凝麦汁を用いて発酵試験を行うと、早凝麦汁からの回収酵母は正常麦汁からの回収酵母より明らかに大きな凝集塊を形成する。そこで、発酵工程を経ずに早凝時の酵母凝集塊を再現する手法を構築し、そのまま濁度変化を測定することにより、早凝活性を測定する系を確立した。本手法の開発により、最短でも3日間の発酵工程が必要であった早凝判定が、わずか1時間で可能となった。また、1回の測定に必要なビール麦サンプルはわずか0.8gとなり、極少量の早凝因子の活性も、簡便かつ迅速に測定できるようになった。

2. 早凝因子の高度な分画

大量の麦芽から効率良く早凝因子を濃縮するために、酵母をアフィニティー担体として利用する手法を開発した。早凝麦汁を用いて発酵試験を行った際の沈降酵母を0.1M~0.5M NaClで洗浄して早凝因子を含む画分を集め、それを陰イオン交換クロマトグラフィーで2度分画した結果、最終的に早凝活性は2つの画分に分かれた多糖成分に回収された。2つの画分の構成糖を調べたところ、共にアラビノース、ガラクトース、キシロースを主成分とする多糖であり、非常に酷似していた。このことから、これらの多糖成分はラムノガラクトチュロナンI骨格を有するペクチン様の構造を有する多糖であり、陰イオン交換クロマトグラフィーで2つの画分に分かれたのは、2つの多糖成分は基本的な構造は同一であるがバックボーンとなるラムノガラクトチュロナンI主鎖の含量（長さ）が異なることが原因であろうと推察された。また、早凝因子が活性を示すためには高分子であることは必須ではなく、それが早凝現象を引き起こす際には、ペクチン様物質で認められるようなCaイオンによる架橋の関与があることが推察された。

3. 早凝因子の構造的特徴

上記 2 で精製した早凝因子の構造解析を試みた。各種レクチンに対する結合性を調べたところ、早凝因子は過去の知見通り Con A 結合性多糖であることが判明した。Con A カラムで分画したところ、早凝活性を示す多糖は 5mM α -メチル-D-グルコシド (m-Glc) で溶出される画分に回収された。Con A カラムに供した多糖のうち、5mM m-Glc 溶出画分として回収されたのは約 13%であり、さらに、5mM m-Glc 溶出画分は元の多糖成分のおよそ 5 倍の比活性を有していたことから、上記 2 で精製した多糖のうち 80%以上は早凝活性を持たない多糖が混入していたことが判明した。素通り画分と 5mM m-Glc 溶出画分の構成糖を調べたところ、2つの構成は類似していたことから、これら 2 種の多糖は構造が類似しているが、早凝活性の有無が異なる多糖であることが明らかとなった。これらの多糖はキシラン骨格、ラムノガラクチュロナン I 骨格、及び、アラビノガラクトタン (タイプ I / II) 骨格を有することが推定された。5mM m-Glc 溶出画分には素通り画分よりも多くの (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) 結合のガラクトースが認められたことから、タイプ II アラビノガラクトタンが早凝活性に重要な構造体である可能性が示唆された。早凝活性に重要な構造体を絞り込むために、早凝因子を糖分解酵素で分断した後、生成物を精製した結果、わずか 30ppb で早凝活性を示す多糖成分が回収できた。この結果から、早凝因子は酵母に極めて特異的に認識される構造を持つ、特殊な多糖成分であることが示唆された。

以上、本研究により、ビール麦の早凝活性を糖化工程、発酵工程を経ることなく迅速かつ高感度に判定できる手法が開発された。一方、早凝や早凝因子の生成メカニズムの詳細を完全に解明するためには、免疫染色等の極めて特異性が高く、かつ、高感度な早凝因子の検出系が必須であることが明らかとなった。本研究によって、早凝活性を持つ多糖成分のみに結合する特異的な抗体を作成することで、ビール業界にとって長年の課題である早凝問題を完全に解明し得るとの重要な示唆を与えることができた。