[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.63, No.1, pp.25~28, 1989]

酵母 *Torulaspora delbrueckii* の冷凍耐性株と 感受性株からのマンナンの抽出とその性状

新本洋士*, 渡部保夫, 玉井洋一, 高桑正義**

(愛媛大学農学部, *現在, 雪印乳業株式会社技術研究所, **現在, 西南女学院短期大学)

昭和 63 年 6 月 24 日 受 理

Preparation and Some Properties of Yeast Mannans from Freeze Resistant and Sensitive Strains of *Torulaspora delbrueckii*

Hiroshi SHINMOTO, Yasuo WATANABE, Youichi TAMAI and Masayoshi TAKAKUWA
Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790

Yeast mannans were prepared from three strains of *Torulaspora delbrueckii*: freeze resistant strain Y-134-5 and sensitive strains IFO 0430 and IFO 0431. Acetolysis fingerprint and double immunodiffusion test with a serum against *Saccharomyces cerevisiae* wild type mannan showed that IFO 0430 and IFO 0431 had a similar mannan structure to that of *S. cerevisiae* wild type. Mannan from Y-134-5 did not react with the serum indicating that Y-134-5 had a different mannan side chain structure from *S. cerevisiae* wild type and the other two strains of *T. delbrueckii*.

(Received June 24, 1988)

酵母細胞の表層は、最外層に水溶性多糖であるマンナンと不溶性グルカンを含む細胞壁からなっており、細胞の構造維持と、種々の情報の伝達に重要な役割を果たしていると考えられている⁽¹⁾。筆者らは先に圧搾パン酵母を 30°C に貯蔵すると、マンナンを含む細胞壁の構成成分が、酵母の軟化（自己消化）時に著しく遊離することを認め、これによって細胞壁の強度が低下し、内容物の漏出が起これと考へた⁽²⁾。また、プロトプラスト再生の過程での細胞壁成分の再構成が、酵母の生理状態に大きく影響することを推論した^(3,4)。

そこで今回は酵母 *Torulaspora delbrueckii* の冷凍耐性株 Y-134-5 と冷凍感受性株 IFO 0430 および IFO 0431 のプロトプラストの浸透圧感受性、細胞壁マンナンのアセトリンスパターンと血清学的反応性について比較検討して、冷凍耐性と細胞壁構造の関係について考察した。

材料および方法

1. 酵母 *T. delbrueckii* Y-134-5 は三共株式会社から供与された。*T. delbrueckii* IFO 0430, IFO 0431 は永井進博士より分与された。酵母はグルコース 4%, ペ

プトン 1%, 酵母エキス 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, MgSO_4 0.2% からなる 5 ml の培地中で 20 時間静置培養後、200 ml の培地にこれを接種し、27 時間好気的に振とう培養した。

2. プロトプラストの調製と浸透圧感受性の測定
27 時間培養の 1.5 ml を洗浄し、菌体を 4 ml の 0.1 M Na_2SO_3 , 0.8 M KCl, 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) にけんだくし、12 ユニットの Zymolyase (キリンビール) を加え 30°C で 60 分間消化した^(4,5)。プロトプラストは 1.2 M ソルビトール, 10 mM MgCl_2 を含む 10 mM イミダゾール塩酸緩衝液 (pH 6.0) で 2 回洗浄し、3 ml の同じ緩衝液にけんだく後、その 0.3 ml を 0~1.2 M ソルビトール 2.7 ml で希釈し 600 nm の吸光度を測定した⁽⁶⁾。測定値はそれぞれプロトプラストを 1.2 M のソルビトールで希釈したときの吸光度に対する百分率で表わした。

3. マンナンの調製 酵母 60 g に 30 ml の 0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え 90 分間オートクレーブした。遠心沈殿はさらに 45 ml の緩衝液でオートクレーブ抽出を行い、抽出液をエタノール沈殿、フェーリング沈殿することによってマンナンを精製した⁽⁷⁾。

4. マンナンのアセトリシス マンナン 50 mg を 10 ml の 0.1 N NaOH に溶解し 25°C で 18 時間 β -elimination を行い酢酸で中和後、水に対して透析してセリン、スレオニンに結合していたオリゴ糖を除いた⁽⁸⁾。これを凍結乾燥後、ピリジン：無水酢酸 (1:1) 中で 100°C、8 時間アセチル化し減圧乾固した後、無水酢酸：酢酸：硫酸 (10:10:1) 混液中でアセトリシスした。アセトリシス生成物はクロロホルムで抽出後、 $\text{Na}(\text{CH}_3\text{O})$ で脱アセチル化した。アセトリシスで得たオリゴ糖は、0.7×39 cm の Biogel P-2(-400 メッシュ) に負荷して分画した⁽⁹⁾。

5. マンナン組成の化学分析 タンパクはウシ血清アルブミンを標準とするローリー法⁽¹⁰⁾、糖はマンノースを標準とするフェノール硫酸法で⁽¹¹⁾、また有機リンはパートレット法で定量した⁽¹²⁾。

6. 細胞壁タンパク抗原の検出 *Saccharomyces cerevisiae* 細胞壁タンパク抗原に対する抗体は既報のとおり調製した⁽¹³⁾。*T. delbrueckii* 菌体を生理食塩水にけんだくし、ガラスビーズとともに 0°C で 10 分間振とうして菌体を破碎後、15,000×g、10 分間遠心した上清を試料とし、抗血清に対し寒天ゲル内 2 重拡散法で抗原の有無を検出した⁽¹³⁾。

7. マンナンの血清学的反応性 *S. cerevisiae* X 2180-1 A 加熱死菌を家兎に免疫して *S. cerevisiae* 野生型マンナンに対する抗血清を調製した。精製したマンナンを生理食塩水に溶解し、寒天ゲル内 2 重拡散法で抗血清との反応を検討した。

結 果

1. プロトプラストの浸透圧感受性

細胞膜の強度の指標として、酵母を Zymolyase でプロトプラスト化し、浸透圧に対する感受性を調べた。Fig. 1 に示すように IFO 0430 は若干浸透圧感受性が低かったが、Y-134-5、IFO 0431 とともに浸透圧感受性に大きな差はなく、冷凍耐性酵母のプロトプラストがとくに浸透圧に対して強いというわけではなかった。

2. 細胞壁マンナンの抽出

3 種類の *T. delbrueckii* から熱水抽出によって細胞壁マンナンを抽出した。Table I に示すようにマンナンの収量は Y-134-5 が最も多かった。調製したマンナンは約 90% の糖と 10% 以下のタンパク、そして少量のリン酸を含んでおり、*S. cerevisiae* 野生型 マンナンの組成とは

ほぼ同じであった。3 種類の酵母から調製したマンナンを 2 N トリフルオロ酢酸中で 100°C 3 時間加水分解した後、薄層クロマト展開して硝酸銀法で発色させたところ、マンノースのスポットのみが検出された。

3. マンナンのアセトリシス

3 種類の *T. delbrueckii* から調製したマンナンをアセトリシスし、ゲルろ過による分画を行った。アセトリシスはマンナン鎖中の主鎖の α -1→6 結合を選択的に切断する。Fig. 2 に示すように IFO 0430、IFO 0431 のマンナンからは、マンノース、マンノビオース、マンノトリオース、マンノテトラオースが主に生じ、これらのパタ

Fig. 1. Susceptibility of Protoplasts Prepared from Three Strains of *T. delbrueckii* to Osmotic Pressure. Yeast cells were digested with Zymolyase. Resulted protoplasts were suspended into each concentration of sorbitol and the turbidity ($A_{600\text{nm}}$) was measured.

Table I. Chemical Composition of Mannan Preparations from Three Strains of *T. delbrueckii*

Yeast strain	Yield ^a	Percentage composition		
		Sugar	Protein	Phosphate
Y-134-5	1.33	89.4	6.4	1.0
IFO 0430	0.92	91.3	6.7	1.9
IFO 0431	0.75	88.4	8.6	2.7

^a Expressed in grams per wet weight of yeast (60 g).

Fig. 2. Acetolysis Patterns of Mannans from Three Strains of *T. delbrueckii*. Acetolysis products of three yeast mannans were chromatographed on Bio-gel P-2 column and the sugar concentration of each fraction was determined. Peak 1~4 correspond to mannose through mannotetraose.

Fig. 3. Double Immunodiffusion Test of Four Yeast Mannans. Antiserum against *S. cerevisiae* X 2180-1 A (S) was used. Antigen wells contained mannans from *S. cerevisiae* X 2180-1 A (A), *T. delbrueckii* Y-134-5 (B), IFO 0430 (C) and IFO 0431 (D).

ーンは *S. cerevisiae* 野生型のものとはほぼ同じであった。Y-134-5 のマンナンでは、マンノースからマンノテトラオースのオリゴ糖の他に、アセトリシス抵抗性の多糖が V_0 付近に溶出された。

4. マンナンの血清学的反応性

S. cerevisiae 野生型酵母 (X 2180-1 A) を家兎に免疫して作製した抗血清を用い、*T. delbrueckii* マンナンとのゲル内免疫 2 重拡散試験を行った。このようにして作製した抗血清はマンナン中の α -1 $\rightarrow$ 3 結合したマンノ-

Table II. Detection of Thermo Labile Protein Antigens on Three Strains of *T. delbrueckii*

Yeast strains	Thermo labile antigens ^a				
	a	b	c	d	e
Y-134-5	+	+	+	+	+
IFO 0430	+	+	+	+	+
IFO 0431	+	+	+	+	+

^a Each antigen was detected by double immunodiffusion test.

ス側鎖と特異的に反応する⁽¹⁴⁾。Fig. 3 に示すように、抗血清は *T. delbrueckii* IFO 0430, IFO 0431 のマンナンと反応し、その沈降線は *S. cerevisiae* 野生型株のマンナンによる沈降線と融合した。これに対し *T. delbrueckii* Y-134-5 のマンナンは、この抗血清とは全く反応しなかった。

5. 細胞壁タンパク抗原の検出

S. cerevisiae 細胞壁タンパク抗原に対する抗血清を用いて *T. delbrueckii* 細胞壁に、これらのタンパク抗原が存在するかどうか検討した。これらの抗原をすべて表現している酵母は、現在までに調べた限りでは *Saccharomyces* 属の酵母のみである (未発表データ)。Table II に示すように、細胞壁の主要なタンパク抗原である TLA a~e は、3 種類の *T. delbrueckii* すべてに存在した。

考 察

冷凍耐性酵母は冷凍パン生地 の製造に伴って発見され、*T. delbrueckii* の他に、*S. cerevisiae* でも高い冷凍耐性を示すものが見出され、すでに一部のものは実際の冷凍パン生地に使用され始めている⁽¹⁵⁾。冷凍耐性の機構については、細胞膜や細胞壁タンパク成分、呼吸系酵素等について検討されているが、未だ決定的な説明はなされていない。酵母細胞壁のマンナンについては、Ballou 一派によって広く構造的、遺伝的な研究が行われており、*S. cerevisiae* におけるマンナンの生合成については、すでにほぼ解明されている^(14,16)。また *S. cerevisiae* 以外にも多くの酵母のマンナン構造が明らかにされており、酵母分類における 1 つの指標となっている⁽¹⁷⁾。筆者らは冷凍耐性の要因の 1 つが、細胞壁の構造にあるのではないかと考え、酵母細胞壁マンナンを抽出精製し、アセトリシスパターンの比較、抗血清との反応性について検討した。

マンナンのアセトリシスを行い、生成したオリゴ糖を

分離したところ、冷凍耐性酵母のマンナンにはアセトリシス耐性の部分が比較的多いが、分枝オリゴ糖鎖長については冷凍感受性株とは大きな差がないことが明らかになった (Fig. 2). アセトリシスはマンナンの α -1 $\rightarrow$ 6 結合した主鎖を選択的に開裂させ、側鎖オリゴ糖を遊離させる^(9,14). *S. cerevisiae* 野生型マンナンの側鎖は α -1 $\rightarrow$ 3 結合や α -1 $\rightarrow$ 2 結合を持ったマンノビオース、マンノトリオース、マンノテトラオースから成り、アセトリシスによってこれらのオリゴ糖が生じる. アセトリシスによって、今回検討した3種類の *T. delbrueckii* のマンナンからも *S. cerevisiae* マンナンからのものと類似の鎖長のオリゴ糖が生じたことから、*T. delbrueckii* のマンナンも α -1 $\rightarrow$ 6 結合した主鎖に4糖以下のオリゴ糖が側鎖として結合した構造であると考えられる. しかしながら、血清学的反応によって、Y-134-5 のマンナン側鎖は他の *T. delbrueckii* や *S. cerevisiae* 野生株とは全く異なっていることが明らかになった. α -1 $\rightarrow$ 3 結合した末端マンノオリゴ糖単位を認識する抗血清を用いた免疫2重拡散において、*T. delbrueckii* IFO 0430 と IFO 0431 のマンナンは沈降線を形成した (Fig. 3) ことから、この2種類の酵母マンナンは *S. cerevisiae* 野生型のものと同じで、 α -1 $\rightarrow$ 6 結合した主鎖に末端部分が α -1 $\rightarrow$ 3 結合した4糖以下のマンノオリゴ糖が側鎖として結合しているものと思われる. これに対し、Y-134-5 のマンナンは抗血清との間に沈降線を作らなかった. したがって、Y-134-5 のマンナンは、 α -1 $\rightarrow$ 6 結合した主鎖にマンノオリゴ糖が側鎖として結合している構造は類似しているものの、末端 α -1 $\rightarrow$ 3 結合を持ったオリゴ糖側鎖はほとんど含んでいないと考えられる. このことを確認するためには、Y-134-5 マンナンから得られたオリゴ糖のメチル化分析を行う必要がある.

最近中富らは、酵母の大きさが冷凍耐性と関連していることを示したが⁽¹⁸⁾、これは、細胞体積あたりの細胞表面積の割合が大きいほど冷凍耐性が高いと考えることができる. したがって、細胞壁が冷凍耐性機構に果たす役割はきわめて大きいかもしれない. マンナン構造の違いが冷凍耐性とどのように関連しているかは明らかではないが、先にも報告したように圧搾パン酵母の軟化 (自己消化) 時に酵母細胞壁成分が遊離してくることを考えると、細胞壁の最外層を構築するグルカン-マンナン構造が酵母の耐久力や冷凍耐性に大きな役割を果たしていることが考えられる.

要 約

Torulaspora delbrueckii の冷凍耐性株 Y-134-5 と冷凍感受性株 IFO 0430, IFO 0431 のプロトプラストの浸透圧感受性、細胞壁マンナンのアセトリシスパターンと血清学的反応性について比較検討した. その結果、冷凍耐性酵母と感受性酵母のプロトプラストの浸透圧感受性、マンナンのアセトリシスパターンには差はなかった. しかし、IFO 0430, IFO 0431 のマンナンがマンノースの α -1 $\rightarrow$ 3 結合に特異的な抗血清と反応したのに対し、Y-134-5 のマンナンは反応しなかった. これらのことから、細胞壁マンナン構造が冷凍耐性に何らかの寄与をしていることが推定された.

- (1) 柳島直彦, 大島泰治, 大隅正子 編:「酵母の解剖」, 講談社, 1981, p.16.
- (2) 新本洋士, 新本美智枝, 玉井洋一, 高桑正義: 農化, **57**, 427 (1983).
- (3) 玉井洋一, 新本洋士, 高桑正義: 農化, **57**, 667 (1983).
- (4) Y. Tamai, C. Kawabe and M. Takakuwa: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1063 (1984).
- (5) K. Kitamura and Y. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1761 (1981).
- (6) Y. Watanabe, M. Shinmoto and M. Takakuwa: *J. Appl. Biochem.*, **4**, 459 (1982).
- (7) S. Peat, W. J. Whelan and T. E. Edwards: *J. Chem. Soc.*, 29 (1961).
- (8) T. Nakajima and C. E. Ballou: *J. Biol. Chem.*, **249**, 767 (1974).
- (9) T. S. Stewart, P. B. Mandershausen and C. E. Ballou: *Biochem.*, **7**, 1843 (1968).
- (10) O. H. Lowly, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (11) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- (12) G. R. Bartlett: *J. Biol. Chem.*, **234**, 466 (1959).
- (13) Y. Tamai, H. Shinmoto, S. Naiho and M. Takakuwa: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2933 (1982).
- (14) C. E. Ballou: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **44**, 239 (1974).
- (15) 田中康夫: 化学と生物, **24**, 564 (1986).
- (16) C. E. Ballou: *Adv. Microb. Physiol.*, **14**, 93 (1976).
- (17) J. Kocouvek and C. E. Ballou: *J. Bacteriol.*, **100**, 1175 (1969).
- (18) 中富康夫, 原 克彦, 梅田三男, 市川真琴: 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p.332.