総 説

酵母 *Torulaspora pretoriensis* の製パン用菌株としての利用

(平成8年度 日本食品科学工学会奨励賞)

小 田 有 二*

Utilization of the Yeast *Torulaspora pretoriensis* as a Baking Strain

Yuji ODA*

* Department of Food Science and Technology, Fukuyama University

パンは、小麦粉、水、酵母および砂糖を混捏してできた生地を発酵後、焼成して作られる。このとき、酵母がパン生地を膨張させて特有の香ばしい風味を与えるのは、小麦粉中に存在する糖を発酵して炭酸ガスとエタノールに分解するためであり、そのメカニズムは基本的にアルコール発酵のそれと同一である。しかし、製パンとビール、ワイン、清酒などの醸造における発酵過程を比較すると、様々な相違点があり、それぞれの用途に適した酵母が使用されているのがわかる¹⁾。

著者は、製パン用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に必要とされる様々な形質を遺伝子レベルまで掘り下げて解析し、得られた知見をもとに新規な菌株を造成した^{2)~12)}。その後、現在の大学に移ったのを機会に、別の角度からパン酵母に関する研究を継続することにした¹³⁾。ここでは、酵母 *Torulaspora pretoriensis* の性質と製パン用菌株としての利用の可能性について述べる。なお、本総説はパン酵母の機能解析とその応用に関する研究の一部をまとめたものであり、その他の部分については既発表の総説を参照していただきたい¹⁴⁾。

1. *Torulaspora* 属酵母からパン生地発酵力の高い菌株の選抜

近年、パン生地中での冷凍耐性は酵母にとって重要視される性質のひとつとなっており¹⁵⁾、数種の冷凍生地で酵母が開発されている。これまでに、著者は *S. cerevisiae* の中から冷凍生地製パン法に適した菌株を選抜し、

接合による菌株改良を行ったが、従来のパン酵母と冷凍生地で用いる酵母の長所を兼ね備えたような菌株は取得できなかった。一方、パン生地中で冷凍障害を受けにくい菌株として、*S. cerevisiae* 以外の酵母が見出されていた¹⁶⁾。それらの中には *T. delbrueckii* と同定されたものが多く¹⁷⁾¹⁸⁾、商品化されている菌株もあった。ところが、これらの菌株はパン酵母に必須とされるマルトース発酵性を欠損していた。糖を添加しない無糖パン生地における主要な発酵性糖は、小麦粉中のアミラーゼによってデンプンから生じるマルトースであるため、製パン用酵母には強いマルトース発酵力が必要なのである。

著者は、*Torulaspora* 属酵母には冷凍耐性を備えた菌株が多いのではないかと予想し、各種研究機関保存の *T. delbrueckii* 27 株、*T. globosa* 5 株および *T. pretoriensis* 3 株の 5% グルコース添加パン生地発酵力（小麦粉 10 g にグルコース 0.5 g を添加したパン生地から 2 時間当たりに発生する炭酸ガス量）とマルトース発酵性について調べた（図 1）²⁰⁾。市販非冷凍耐性株 *S. cerevisiae* FL 2209 および市販冷凍耐性株 *T. delbrueckii* SANK 50268 と比較して、調べた菌株にはパン生地発酵力の低いものが多かったが、*T. pretoriensis* の type strain, IFO 10218 だけは同程度の高い値を示した。本菌株はマルトース発酵性を有しており、菌体収量も特に低くはなかった。この菌株のパン生地中における冷凍耐性について調べた。発酵させたパン生地を冷凍保存し、解凍後の発酵力を測定すると、*S. cerevisiae* FL 2209 では凍

* 福山大学工学部（〒729-02 広島県福山市学園町一番地三蔵）

結保存 7 日めで 20% にまで低下したが, *T. pretoriensis* IFO 10218 と *T. delbrueckii* SANK 50268 では 60% 以上残存していた (図 2)。

このように, *T. pretoriensis* IFO 10218 は冷凍生地用酵母としての性質を備えていたが, 二つの欠点があった。ひとつは, 培養菌体が高い凝集性を示すために, 均一な懸濁液を調製できないことであった。そこで, 変異処理後, 沈降にくい菌体を集積培養し, 非凝集性変異株 YK-1 を取得した。この YK-1 を使用して冷凍生地製

パン試験を行ったところ, *S. cerevisiae* FL 2209 と比較して, 一定期間凍結保存してもホイロ時間の延長および焼成後の比容積の低下が少なかった²⁰⁾。もうひとつの欠点は, マルトース発酵性を備えてはいても, 無糖パン生地発酵力が低いことであった。*T. pretoriensis* YK-1 をマルトースで培養すると, 無糖パン生地発酵力および α -グルコシダーゼ活性は最高になったが, それでも市販パン酵母より低かった。

2. *Torulaspora* 属酵母とは?

T. pretoriensis の中にはワイン醸造に利用されている菌株や, 発酵したパン生地に見出された菌株もあるが¹⁹⁾, あまりなじみのある種ではない。*T. pretoriensis* YK-1 をパン酵母として実用化するためには, この菌株のみならず *Torulaspora* 属についても十分に知る必要があった。

Torulaspora は, 酵母分類学が 19 世紀後半に開始されてまもなく創設された属である²¹⁾。その後 LODDER and KREGER-VAN RIJ は, *Torulaspora* 属の 3 種を *Zygosaccharomyces* 属の多くの種とともに *Saccharomyces* 属中に組み込んだものの, VAN DER WALT and JOHANSEN は両属を再度分離独立させた²²⁾。これらの経緯からもわかるように, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* および *Saccharomyces* の 3 属は互いに近縁と考えられる。ただし, 分類の記載によれば生活史には明確な違いがあり²¹⁾, *Saccharomyces* 属では通常の増殖細胞は二倍体あるいはそれ以上の高次倍数体で, 出芽した子嚢胞子は直ぐに接合する。一方, *Torulaspora* 属と *Zygosaccharomyces* 属では, 一倍体の細胞が増殖を繰り返して, 子嚢胞子を形成する際に二倍体化する。さらに, *Torulaspora* 属では母細胞と出芽細胞が接合し, *Zygosaccharomyces* 属では別々の細胞間で接合が起きるという点で異なる。このように, *Torulaspora* 属酵母では, 異なる菌株同士の交雑ができないために, 古典的な方法による遺伝解析ができない。そこで, 以下のように *Torulaspora* 属酵母の諸性質について調べた。

3. *Torulaspora* 属酵母の分子遺伝学的性質

核染色体 DNA をパルスフィールドゲル電気泳動で分離したときのパターンは電気泳動核型と呼ばれており, 酵母分類における有力な研究手法のひとつとなっている。*Torulaspora* 属酵母の大部分では 6 本程度のバンドが 800 から 2 000 kb までの間に, *Zygosaccharomyces* 属酵母では 1 000 kb 以上に分布するパターンを示し

図 1 各種 *Torulaspora* 属酵母の 5% グルコース添加パン生地発酵力

図 2 パン生地発酵力に対する凍結保存期間の影響

- : *T. pretoriensis* IFO 10218
- △ : *T. delbrueckii* SANK 50268
- : *S. cerevisiae* FL 2209

た²³⁾。これまでに数多くの酵母について電気泳動核型が調べられているが、解析を簡略化するために染色体 DNA を 500 kb 以下の小型、500~1 000 kb までの中型、1 000 kb 以上の大型の 3 クラスに分類している。子囊酵母では、通常大型クラスの染色体 DNA が 1~5 本観察され、小・中型クラスはまれにしか検出されない。ところが *Saccharomyces* 属だけは例外で、*Saccharomyces sensu stricto* グループ (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*) と *S. exiguus* では 3 クラスすべて、4 種の *Saccharomyces sensu lato* グループ (*S. castellii*, *S. dairensis*, *S. servazzii*, *S. unisporus*) では中・大型クラス、*S. kluyveri* では大型クラスの各染色体 DNA から構成されている。電気泳動核型で見ると、*Torulaspora* 属は *Zygosaccharomyces* 属よりも *Saccharomyces* 属に近く、特に *Saccharomyces sensu lato* グループに類似していた。

S. cerevisiae では、すでに宿主・ベクター系が確立されており、その中には内在性プラスミド 2 μ mDNA をもとに造成された YEp 型ベクターがある。*Z. rouxii* や *Z. bailii* にも類似の構造をもったプラスミドが見出されているので、上記の各種 *Torulaspora* 属酵母についても調べたが、このようなプラスミドは検出できなかった。しかし、内在性プラスミドが発見されていない *S. exiguus* および *S. kluyveri* では、*S. cerevisiae* のベクタープラスミドが複製可能である。*T. delbrueckii* では、プロトプラスト法により YEp 型プラスミドが導入可能であることも報告されていた。そこで、*T. pretoriensis* YK-1 の *ura⁻* 株を、リチウム法により *S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子をもつ 4 種のプラスミドで形質転換させた (表 1)²⁴⁾。*T. pretoriensis* における形質転換頻度は *S. cerevisiae* の 1/100 程度であったが、YIp 5 以外の 3 種

類のプラスミドで形質転換可能であり、その中で YCp 50 がもっとも安定して保持された。このように、*S. cerevisiae* 用のベクタープラスミドの多くが *T. pretoriensis* において利用できることがわかった。

4. *Torulaspora* 属酵母の生理・生化学的性質

T. pretoriensis YK-1 は *S. cerevisiae* と何ら変わりなく培養できたが、培地中の塩に対する挙動だけは異なっていた¹⁹⁾。*S. cerevisiae* の製パン用菌株の多くは、酵母エキス、ペプトン、糖などを栄養源として培養するとき、培地中に 3% 程度の NaCl を添加しておかないと、市販圧搾酵母並みのパン生地発酵力をもった菌体は取得できない²⁵⁾。工業規模での培養では、無機塩を多く含む廃糖蜜を生育に合わせて添加している。その結果、定常期の酵母細胞は高塩濃度下で生育しており、このとき高いパン生地発酵力を獲得しているのである。一方、*T. pretoriensis* YK-1 および *T. delbrueckii* SANK 50268 のパン生地発酵力は NaCl 非存在下で培養すると高く、NaCl 存在下では反対に低下した。これらは、高塩濃度ストレスに対する応答の違いによるものと考えられるが、詳細については不明である。

次に、パン酵母にとって重要と考えられる 3 種の酵素について調べ、*S. cerevisiae* 由来のものと比較した。 α -グルコシダーゼ²⁶⁾とインベルターゼ²⁷⁾は、それぞれ無糖およびシュクロース添加パン生地の膨張に必須の酵素であり、*T. pretoriensis* YK-1 より精製した *S. cerevisiae* のインベルターゼには、菌体内に局在し、構成的に発現している internal 型およびペリプラズムに局在し、グルコースによるカタボライトリプレッションを受ける external 型の二種類がある。*T. pretoriensis* YK-1 には、internal 型はなく、external 型のみが存在してい

表 1 4 種のプラスミドによる形質転換効率と形質転換体におけるプラスミドの安定性

菌株	プラスミド	形質転換効率 (形質転換体数/ μ gDNA)	安定性 (%)
<i>T. pretoriensis</i> FL 2237 (YK-1 <i>ura⁻</i>)	YEp 24	55 $\pm$ 16	5.5 $\pm$ 1.3
	YRpHI	19 $\pm$ 2	9.7 $\pm$ 3.0
	YCp 50	32 $\pm$ 10	46.2 $\pm$ 5.3
	YIp 5	検出不能	—
<i>S. cerevisiae</i> FL 2214 (X2180-1A <i>ura⁻</i>)	YEp 24	4 950 $\pm$ 1 090	81.9 $\pm$ 13.3
	YRpHI	1 950 $\pm$ 1 700	3.0 $\pm$ 1.0
	YCp 50	637 $\pm$ 227	32.1 $\pm$ 3.9
	YIp 5	0.16 $\pm$ 0.06	100

た。α-ガラクトシダーゼは甜菜糖蜜でパン酵母を培養する際、菌体取得量を向上させ、廃液のBODを低減させるのに必要な酵素である。Torulaspora 属酵母中でメリビオースを発酵した菌株は *T. delbrueckii* IFO 1255 だけであった²⁸⁾。α-ガラクトシダーゼの生産は、*S. cerevisiae* と同様に、基質であるメリビオースの他にガラクトースでも誘導された。インベーターゼとα-ガラクトシダーゼは、オリゴマーを形成する糖タンパク質であり、酵母のペリプラズムに局在する酵素に共通する特徴を示した。精製したそれぞれの酵素の物理化学的および酵素化学的性質は、*S. cerevisiae* 由来のものに類似しており、特にα-グルコシダーゼではN末端アミノ酸20残基中、13残基が一致した。

5. *T. pretoriensis* YK-1 のマルトース発酵力の増強

T. pretoriensis YK-1 を実用化するためには、マルトース発酵力を増強する必要があった。酵母 *S. cerevisiae* には、少なくとも5種類のマルトース発酵性遺伝子 (*MAL1*, *MAL2*, *MAL3*, *MAL4* および *MAL6*) があり、いずれか一つでも有している菌株はマルトースを発酵できる。そのうちのひとつ *MAL6* 座位は、マルトースパーミターゼをコードする *MAL61*、α-グルコシ

ダーゼをコードする *MAL62* および *MAL* 活性化因子をコードする *MAL63* の3種類の遺伝子から成り立っており (図3)、他の *MAL* 座位も *MAL6* 座位と同様の構造である²⁹⁾。マルトースパーミターゼとα-グルコシダーゼの過剰生産は、*MAL63* に相当する遺伝子内の変異であることが知られているが、そのような変異株を *T. pretoriensis* YK-1 から取得することはできなかった。

そこで、*T. pretoriensis* YK-1 でもっとも安定に保持されたプラスミドベクター YCp 50 に *S. cerevisiae* 由来の *MAL61* および *MAL62* 遺伝子を強いプロモーター下流に連結したプラスミドを造成した (図4)³⁰⁾。*T. pretoriensis* YK-1 に pYCM 61 を導入するとマルトースパーミターゼ活性、pYCM 62 を導入するとα-グルコシダーゼ活性、pYCM 612 を導入すると両酵素活性が上昇したが、市販パン酵母ほどではなかった。液体培地でのマルトース発酵力を、24時間で発生した炭酸ガスの重量として測定すると、pYCM 61 または pYCM 62 を導入することによりわずかに上昇し、pYCM 612 を導入するとさらに上昇していた。これは、*T. pretoriensis* YK-1 において、マルトースパーミターゼとα-グルコシダーゼの両方がマルトース発酵における律速段階であることを示唆していた。しかし、これらの菌体の無糖およびグルコース添加パン生地発酵力には、ほとんど差が認められなかった。

パン生地中における糖の発酵過程は、液体培地よりもかなり複雑である。小麦粉中には、グルコース、フルクトース、シュクロースなどが小麦粉重量の約0.25%含まれているが、パン生地中ではアミラーゼ類の作用によってデンプンからマルトースが生成し、その量は2.8%程度に達する。無糖パン生地において、酵母は30から60分以内に少量存在するグルコースやフルクトースなどを

図3 *S. cerevisiae* の *MAL6* 座位の構造

Hp, *Hpa* I; Ps, *Pst* I, R, *Eco* RI; S, *Sal* I; Sm, *Sma* I.

図4 *MAL61* および *MAL62* を含むプラスミドの構造

MAL61 および *MAL62* は、それぞれ *S. cerevisiae* 由来のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモーター (PTDH) 下流に連結した。

表 2 無糖およびシュクロース添加パン生地発酵力

菌 株	培地中の糖源	パン生地発酵力 (ml/[2 h・10 g 小麦粉])		比 率 (無糖/シュクロース添加)
		無 糖	シュクロース添加	
<i>T. pretoriensis</i> IFO 0022	シュクロース	31.4±1.1	42.1±1.0	0.75
	マルトース	42.3±0.6	44.3±2.9	0.92
<i>T. pretoriensis</i> YK-1	シュクロース	25.3±0.2	45.7±1.1	0.57
	マルトース	27.9±2.4	51.4±2.3	0.53
<i>S. cerevisiae</i> FL 2209	シュクロース	37.4±0.1	46.1±0.9	0.79
	マルトース	49.5±2.9	55.5±2.0	0.87

消費し、その後マルトースを発酵する。このような基質の変化に素早く対応するために、パン生地中の酵母菌体はマルトースパーミターゼと α -グルコシダーゼの両酵素活性が高くなければならない。*T. pretoriensis* YK-1において、導入された*S. cerevisiae* 由来のMAL遺伝子は無糖パン生地発酵力を改善するのに十分なほど発現してはいなかったと考えられる。

6. 無糖パン発酵力の高い *T. pretoriensis* IFO 0022 の性質

グルコース添加パン生地発酵力が低いので注目していなかった *T. pretoriensis* IFO 0022 は、その後の検討から無糖パン生地発酵力が特に高く (表 2), *T. pretoriensis* YK-1 と同等の冷凍耐性を備えていることがわかった³¹⁾。*T. pretoriensis* IFO 0022 は、*T. pretoriensis* YK-1 と比較して液体培地でのグルコース発酵力は劣るが、マルトース発酵力は優れていた。マルトースパーミターゼと α -グルコシダーゼの両酵素活性は、ともに *T. pretoriensis* YK-1 よりも 10 倍以上高く、市販パン酵母並みであった³⁰⁾。さらに両酵素の動力学的性質は、*T. pretoriensis* YK-1 由来のものと大差なかったことから、無糖パン生地発酵力の差異はマルトース発酵性遺伝子の発現量に起因すると推定した³⁰⁾。

これらの結果から、*T. pretoriensis* YK-1 と IFO 0022 のマルトース発酵性遺伝子の構造と機能を比較検討することにより、*T. pretoriensis* YK-1 の具体的な改良方法が明らかになると考えている。

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りまじた福山大学教授外村健三先生、並びに協和発酵工業株式会社大内弘造先生に謹んで謝意を表します。また、有益なご助言をいただきました、北海道大学教授冨田房男先

生、福山大学工学部食品工学科および生物工学科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。旭化成、オリエンタル酵母、鐘淵化学、協和発酵、サントリーの各社からは貴重な試料の提供を、エリザベス・アーノルド富士財団、広島県食品工業振興財団には多大なご援助をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。最後に常に暖かい励ましをいただきました恩師、大阪府立大学教授中野長久先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 小田有二・大内弘造：食料科学バイオテクノロジー。木村 光編 (培風館、東京) p. 285 (1989)。
- 2) ODA, Y., UNO, K. and OHTA, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 941 (1986)。
- 3) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1495 (1989)。
- 4) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1742 (1989)。
- 5) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Yeast*, **5**, S135 (1989)。
- 6) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Food Microbiol.*, **7**, 43 (1990)。
- 7) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Food Microbiol.*, **7**, 241 (1990)。
- 8) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 989 (1990)。
- 9) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Curr. Genet.*, **18**, 401 (1990)。
- 10) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Curr. Microbiol.*, **22**, 237 (1991)。
- 11) ODA, Y. and OUCHI, K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 495 (1991)。
- 12) 小田有二・大内弘造：醸協, **86**, 540 (1991)。
- 13) ODA, Y. and TONOMURA, K.: *J. Food Sci.*, **59**, 171 (1994)。
- 14) 小田有二・大内弘造：化学と生物, **29**, 258 (1991)。

- 15) 河合弘康 : 化学と生物, **31**, 374 (1993).
 - 16) HINO, A., TAKANO, H. and TANAKA, Y. : *Cereal Chem.*, **64**, 269 (1987).
 - 17) OSHIMA, Y., SUGAURA, T., HORITA, M. and SASAKI, T. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1512, (1987).
 - 18) HAHN, Y. and KAWAI, H. : *J. Home Econ. Jpn.*, **41**, 115 (1990).
 - 19) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1320 (1993).
 - 20) 小田有二・外村健三 : 日食工誌, **41**, 214 (1994).
 - 21) YARROW, D. : *The Yeast, a Taxonomic Study*. (Elsevier Science Publ., Amsterdam) p.379 (1984).
 - 22) BARNETT, J.A. : *Yeast*, **8**, 1 (1992).
 - 23) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 190 (1995).
 - 24) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Curr. Genet*, **27**, 131 (1995).
 - 25) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Food Microbiol.*, **10**, 249 (1993).
 - 26) ODA, Y. IWAMOTO, Y., HIROMI, K. and TONOMURA, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1902 (1993).
 - 27) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1155 (1994).
 - 28) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 203 (1996).
 - 29) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 266 (1996).
 - 30) ODA, Y. and TONOMURA, K. : *Food Microbiol.*, **12**, 405 (1995).
 - 31) 小田有二・外村健三 : 食科工, **43**, 185 (1996).
(平成 8 年 7 月 22 日受理)
-