

# 博士論文要約 (Summary)

平成25年4月入学  
連合農学研究科 生物資源科学専攻  
氏名 三雲 大

タイトル	製パン用「とち野酵母 <sup>®</sup> 」の菌株改良に関する研究
<p>「序論及び目的」</p> <p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> AK46 は、イーストを含む全ての製パン原料が北海道産であり地域特産品となるパンを作ることによる地域活性化をコンセプトとして、北海道十勝地方に自生するエゾヤマザクラから分離された野生酵母であり、平成22年から日本甜菜製糖株式会社より「とち野酵母<sup>®</sup>」として製パン用活性ドライイースト製品が商品化されている。AK46 は市販パン酵母と比較すると製パン性能に関わるマルトース発酵力に劣るため、本研究ではAK46の製パン性能改善を目的として、2-デオキシグルコース (2-DOG) 耐性変異の付与によりマルトース発酵力が向上した変異株 MCD4 を取得し、製パンに係る各種性能 (酵素活性、液体・生地発酵力、製パン性能) を評価した。また、2-DOG 耐性株 MCD4 のマルトース発酵力が強化された機構の解明を目指し、MCD4 一倍体を用いた 2-DOG 耐性とマルトース発酵力との相関を調べるとともに、マルトース代謝に関わる MAL 遺伝子とカタボライト抑制に関与する遺伝子の塩基配列の比較を行った。</p> <p>「材料及び方法」</p> <p>1. 2-DOG 耐性株の分離・選抜</p> <p>2-DOG とマルトースを含む最少寒天培地に酵母を植菌し、2-DOG 存在下でもカタボライト抑制が誘起されずに培地中のマルトースを資化することで生育出来る菌株を、AK46 を元株とする 2-DOG 耐性株として取得した。取得した <i>S. cerevisiae</i> AK46 由来 2-DOG 耐性株全 5 株 (MCD1~5 と命名) を元株 AK46 とともに培養試験に供し、培養後に菌体収量 (乾物 g/培地 L) を算出、培養菌体を用いて簡易的な製パン性能試験法としてパン生地発酵力 (2 種) を測定し、菌体収量・パン生地発酵力に基づいて菌株の選抜を実施した。</p> <p>2. グルコース存在下でのマルトースの消費量調査</p> <p>選抜した AK46 由来 2-DOG 耐性株「MCD4」がカタボライト抑制に対して非感受性となっているかを確認するために、AK46 由来 2-DOG 耐性株 MCD4 と元株 AK46 に加え、対照株として市販パン酵母菌株分離株 HP216 を試験菌株として使用し、マルトースとグルコースを含む培地で培養した際の糖消費の挙動を調査した。カタボライト抑制に感受性である菌株はグルコースを消費した後にマルトースを消費するが、カタボライト抑制に非感受性となった菌株はグルコースとマルトースを同時期に消費するようになる。培養期間中に培地の一部をサンプリングし、遠心分離により取得した上清を適宜希釈し、HPLC を用いてマルトース、グルコースの糖濃度を定量した。</p> <p>3. 液体発酵力測定 (F10 液体発酵力・M8 液体発酵力)</p> <p>試験菌株の簡易的な発酵力を調査する為に、日本イースト工業会の測定方法を改変し、</p>	

各種糖類とビタミン類・無機塩類などを含む液体培地に培養菌体を接種して、振盪培養した際に発酵と共に生じる炭酸ガス発生に伴う重量減少量を液体発酵力として測定した。測定した2種の液体発酵力は、10% スクロースを糖源としたF10は低糖生地、8.0% マルトースを糖源としたM8液体発酵力は無糖生地を想定したものである。

#### 4. 酵素活性測定（インベルターゼ活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性）

製パンに関係する酵素活性として、スクロース分解酵素であるインベルターゼ、マルトース分解酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼの酵素活性を測定した。インベルターゼ活性は酵母懸濁液を酵素液としてスクロースを基質としたときに、インベルターゼにより生じた還元糖の量を3,5-ジニトロサリチル酸との加熱反応による色調変化を分光高度計にて比色定量した。インベルターゼの活性は、乾物1mgの菌体が1分間あたりに生成する還元糖の量(nmol)と定義して比活性を算出した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性測定に際して、*p*-ニトロフェノール（以下*p*-NP）誘導体である*p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドを基質として使用し、 $\alpha$ -グルコシダーゼによって基質の $\alpha$ -グリコシド結合が切断した際に遊離する*p*-NPを定量した。 $\alpha$ -グルコシダーゼの活性は、乾物1mgの菌体が1分間あたりに遊離する*p*-NPの量(nmol)と定義して比活性を算出した。

#### 5. 生地発酵力測定（無糖生地発酵力、各製パン工程の生地発酵力）

試験菌株のパン生地における発酵力を調査するために、酵母が生地中の糖類を発酵して生じる炭酸ガス発生量の推移を調査した。小麦粉、水、培養菌体を混捏して調製した砂糖を添加しない生地（無糖生地）からの炭酸ガス発生量を無糖生地発酵力として測定した。また、製パン試験実施に併せて、後述する3種の製パン法（中種法、ストレート法、ノータイム法）における各製パン工程で分取した生地の発酵力を同様の手法で調査した。

#### 6. 製パン試験（中種法・ストレート法・ノータイム法）

3種の製パン法にて性能を調査し、製パン性能を評価した。製パン性能の評価項目として、各製法で焼成したパンの体積(ml)と重量(g)を測定して比容積(ml/g)を算出した。中種法での生地発酵力は、中種、本捏生地の2種を測定し、ストレート法・ノータイム法では本捏生地の生地発酵力を測定した。発酵時間はそれぞれの混捏後の発酵工程の所要時間と同一とした。

#### 7. MCD4一倍体の取得・諸性能調査

MCD4のマルトース発酵力強化機構の解明を目指し、同一子嚢由来のMCD4一倍体を取得し、マルトース代謝に関わる形質および2-DOG耐性の分布、マルトース発酵力強化と2-DOG耐性の相関調査を試みた。胞子を形成したMCD4の細胞壁を溶解し、マイクロマニピレーターを用いて1つの子嚢から4つの胞子を分離・培養した。4つ全ての胞子が生育した同一子嚢由来一倍体を全30組120株取得した。

マルトース資化能は、マルトース最少寒天培地に一倍体の懸濁液をスポットし、生育が確認できた菌株を、マルトース資化能を有する菌株と判定した。マルトース発酵能は、マルトースを糖源とする培地にダーラム発酵管を入れ、静置培養時に発酵管中に捕集された炭酸ガスの有無とBTBの色調変化を指標として判定した。2-DOG耐性は2-DOGを含有するマルトースを糖源とした最少寒天培地にスポットし、生育が確認できた菌株を、2-DOG耐性を有する菌株と判定した。

MCD4一倍体の2-DOG耐性の有無とマルトース発酵力の相関調査のため、培養菌体を用いてマルトースを糖源とするM8液体発酵力を測定した。

## 8. 全ゲノム DNA 配列の解析、DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析

MCD4 のマルトース発酵力強化機構を解明するために DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較を行うべく、元株である AK46 と 2-DOG 耐性変異株 MCD4 の全ゲノム DNA 配列を次世代 DNA シーケンサーにて解析した。次世代 DNA シーケンサーで解析した AK46 と MCD4 の全ゲノム DNA の情報から、マルトース代謝に関わる遺伝子、カタボライト抑制に関わる遺伝子の DNA 塩基配列を比較し、変異がみられた遺伝子においてはアミノ酸配列を解析・比較した。

### 「結果」

#### 1. 2-DOG 耐性株の選抜、グルコース存在下でのマルトースの消費量調査

2-DOG 含有マルトース最少寒天培地に生育した全 5 株を AK46 由来 2-DOG 耐性株 (MCD1~5) として取得し、AK46 と同等の菌体収量を示し 2 種のパン生地発酵力が優れ、特にマルトース発酵力に関係する糖無添加生地のパン生地発酵力が AK46 より 4 割ほど高まった MCD4 株を選抜し、以降の試験に使用することとした。

グルコースとマルトースを含む培地にて培養中の残糖量の推移を調査したところ、AK46 と HP216 は培養開始から 60 分以内にグルコースを完全に消費した後にマルトースの消費が始まり、培養終了の 180 分経過時にも 5% ほどのマルトースが残存していたが、2-DOG 耐性株である MCD4 は培養開始時からグルコースとマルトースを同時期に消費し、培養終了時にはマルトースは 1% 程度しか残存しておらず、MCD4 はカタボライト抑制に対して非感受性となっていることが確認された。

#### 2. 製パンに関する性能の評価 (酵素活性、液体・生地発酵力、製パン性能)

*Saccharomyces cerevisiae* AK46 から取得した 2-DOG 耐性変異株 MCD4 の製パンに関する各種性能 (酵素活性、液体・生地発酵力、製パン性能) を調査した。マルトースを糖源とする M8 液体発酵力と  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は AK46 から顕著に高まっており、2-DOG 耐性付与によるマルトース発酵力の向上は  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりに起因している可能性が示唆された。インベルターゼ活性は AK46 と同等であった。

糖を添加しない無糖生地発酵力を調査すると、2-DOG 耐性の付与により MCD4 の発酵開始 1 時間目までのトータルガス発生量は AK46 の約 1.7 倍となり、顕著なマルトース発酵力向上が確認された。実際に製パン試験を実施すると、ストレート法、ノータム法においては 2-DOG 耐性の付与による製パン性能向上は見られなかったが、中種法での製パン性能においては、MCD4 を用いて焼成したパンの比容積は HP216 と同水準であり、2-DOG 耐性の付与による明確な製パン性能の向上が確認された。

#### 3. MCD4 一倍体の諸形質分布、2-DOG 耐性とマルトース発酵力の相関調査

MCD4 一倍体全 120 株は、AK46 および MCD4 (二倍体) と同様に、全菌株がマルトース資化能・発酵能を有していた。同一子囊内での 2-DOG 耐性の形質分布は、全 30 組の内 28 組が「2-DOG 耐性有り : 2-DOG 耐性無し = 2 : 2」、残り 2 組が「2-DOG 耐性有り : 2-DOG 耐性無し = 1 : 3」となり、2-DOG 耐性を有していた一倍体は 58 株、2-DOG 耐性を有していない一倍体は 62 株とほぼ同数であった。

MCD4 一倍体培養菌体の M8 液体発酵力を測定し、2-DOG 耐性の有無との相関を調査したところ、2-DOG 耐性を有する MCD4 一倍体の M8 液体発酵力が高い傾向を示し、その平均値は 2-DOG 耐性を有していない MCD4 一倍体の平均値の 18 倍強であった。

#### 4. DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析

塩基配列を比較した6種のMAL遺伝子のうち、 $\alpha$ -グルコシダーゼをコードするMAL12、MAL32には変異が生じておらず、マルトースパーミアーゼをコードするMAL\_1、そしてアクチベーターをコードするMAL\_3の塩基配列中に、DNAの片一方にのみ変異が存在している混合塩基でのDNA配列置換がみられ、複数のアミノ酸置換や翻訳停止を生じていた。中でもMAL13における一対のDNAの片一方に翻訳停止を生じて領域の一部を欠失したことによる大きな構造変化により、MCD4のマルトース代謝能が高まっている可能性のほか、マルトース代謝能向上の要因の1つに、マルトースパーミアーゼをコードするMAL\_1に生じた変異によりパーミアーゼの活性に変化を生じている可能性も示唆された。カタボライト抑制に関わる11遺伝子においては、いずれも混合塩基での変異ではあるものの、CYC8とGLC7にはアミノ酸置換、GRR1にはアミノ酸残基の欠失がみられた。REG1とHXT4には複数のDNA塩基配列の置換はみられたものの、翻訳時のアミノ酸の置換は生じていなかった。

##### 「結論及び考察」

2-DOG耐性株MCD4のマルトースを糖源とするM8液体発酵力はAK46の3.8倍、マルトースを加水分解する $\alpha$ -グルコシダーゼ活性はAK46の約1.6倍に高まっており、MCD4のマルトース代謝能・発酵能の高まりが確認された。実際にパン生地を調製して発酵力を調査すると、マルトース代謝能の高まりから無糖生地発酵力が向上し、中種法での製パン性能も高まっていたことから、パン酵母菌株に2-DOG耐性を付与することにより実用性能の改善することができた。

MCD4のマルトース発酵力が強化されている要因を解明するために、マルトース代謝に関する遺伝子とカタボライト抑制に関与する遺伝子のDNA・アミノ酸配列を比較・解析した。前述したように、本研究でのマルトース代謝に関わる遺伝子のDNA・アミノ酸配列の比較解析結果より、MCD4には混合塩基での変異ではあるものの、マルトースパーミアーゼをコードするMAL11・MAL31とアクチベーターをコードするMAL13・MAL33に変異を生じており、構造変化や保存領域に生じた変異によりマルトース代謝が高まっている可能性が示唆されている。また、AK46とMCD4において $\alpha$ -グルコシダーゼをコードするMAL12・MAL32の塩基配列は同一であったが、VIII番染色体上に存在するMAL6遺伝子座の $\alpha$ -グルコシダーゼをコードするMAL62の上流・内部での欠失によるカタボライト抑制への影響が研究されており、MAL62のDNA塩基配列上流-253位から-237位のTリッチな領域がカタボライト抑制に関与し、この領域を欠失するとカタボライト抑制環境下における $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が高まると報告されていたが、MAL12及びMAL32の上流にも同様のTリッチ配列が存在しているため、AK46とMCD4のMAL12及びMAL32の上流配列を確認したが、両菌株ともに欠失は見られず同一の配列を有しており、MCD4のマルトース発酵力向上の要因はMAL\_2上流配列の欠失ではなかった。マルトース代謝に関わる遺伝子と同様に、カタボライト抑制に関与する遺伝子のDNA・アミノ酸配列の比較解析を行ったところ、いずれも混合塩基での変異ではあるが、3遺伝子にアミノ酸の置換・欠失を生じていた。CYC8とGLC7にはアミノ酸置換、GRR1にはアミノ酸残基の欠失がみられたが、各種保存領域を外れていたことから、カタボライト抑制に関与する遺伝子の配列解析によりMCD4がカタボライト抑制に非感受性となっていることを確認づける要因の特定には至らなかった。

グルコース存在下でのマルトースの消費を調査した結果からは、MCD4はグルコースとマルトースを同時期に消費していることから、2-DOG耐性が付与されることでカタボライト抑制に非感受性となったことが示唆されている。加えて、MCD4一倍体を用いた試験

結果からは 2-DOG 耐性を有する菌株はマルトースを糖源とする M8 液体発酵力が強い傾向がみられ、2-DOG 耐性付与とマルトース発酵力向上の密接な関連性が確認されている。MCD4 のマルトース発酵力及び中種法での製パン性能が高まった要因は 2-DOG 耐性およびカタボライト抑制非感受性にのみ依存したものではなく、変異により  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を含めたマルトース代謝能のベースが高まったことに加えて、2-DOG 耐性およびカタボライト抑制非感受性の付与によりグルコースとマルトースが共存するパン生地などの環境下においてマルトース発酵力向上に相加的に影響を与えている可能性が示唆された。