

製パン用「とがち野酵母<sup>®</sup>」の  
菌株改良に関する研究

2016.3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(帯広畜産大学)  
三雲 大

# 目次

I . 緒言 . . . . .	4
II . 2-DOG 耐性株の取得・選抜	
材料と方法 . . . . .	13
1 . 2-DOG 耐性株の分離	
2 . 2-DOG 耐性株の選抜	
3 . グルコース存在下でのマルトースの消費量調査	
結果と考察 . . . . .	18
1 . 2-DOG 耐性株の選抜	
2 . グルコース存在下でのマルトースの消費量調査	
要約 . . . . .	22
III . 2-DOG 耐性株 MCD4 の性能調査	
材料と方法 . . . . .	23
1 . 培養菌体の取得	
2 . 液体発酵力測定 (F10 液体発酵力、M8 液体発酵力)	
3 . 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)	
4 . 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)	
5 . 製パン試験 (中種法)	
6 . 製パン試験 (ストレート法)	

7. 製パン試験（ノータイム法）	
結果と考察	33
1. 培養菌体の取得	
2. 液体発酵力測定（F10 液体発酵力、M8 液体発酵力）	
3. 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）	
4. 生地発酵力（無糖生地発酵力）	
5. 製パン試験（中種法）、生地発酵力（中種、本捏生地）	
6. 製パン試験（ストレート法）、生地発酵力（混捏生地）	
7. 製パン試験（ノータイム法）、生地発酵力（混捏生地）	
要約	48

#### IV. MCD4 のマルトース発酵力強化機構の調査

材料と方法	49
1. MCD4 の孢子化、孢子嚢からの一俵体の分離	
2. マルトース資化能調査	
3. マルトース発酵能調査	
4. 同一子嚢内での 2-DOG 耐性の形質分布調査	
5. 2-DOG 耐性とマルトース発酵力の相関調査	
6. 全ゲノム DNA 配列の解析	
7. DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析	
8. リアルタイム PCR での発現量解析	
結果と考察	57
1. マルトース資化能・発酵能調査	

2.	同一子囊内での 2-DOG 耐性の形質分布調査	
3.	2-DOG 耐性とマルトース発酵力の相関調査	
4.	DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析	
5.	リアルタイム PCR での発現量解析	
要約	・・・・・・・・・・・・・・・・	68
V.	総合考察	70
VI.	参考文献	75
VII.	謝辞	80

## I. 緒言

パンは小麦粉あるいはその他の穀粉・水・パン酵母（イースト）を主原料として、これに食塩、砂糖、油脂などを副原料として混捏して生地を作り、酵母の発酵により生成される炭酸ガスを小麦タンパク質のグルテンが包み込むことにより生地を膨張させ、これを高温で焼成することで生地が膨張した状態で固められて製造される。日本ではパン酵母の呼称として「酵母」を意味する英語の「イースト」を慣用的に使用しており、原材料表示の名称となっている。イーストはパン製造工程中において生地発酵によるガス発生による生地の膨張、物性変化と熟成を促進することでパン独特の触感の形成に寄与しているほか、主原料である小麦粉・副原料の成分を分解・代謝変換してアルコール類・有機酸類・アミノ酸類・エステル類・その他揮発性化合物質といった代謝産物を生成することによりパン特有の味・香りを形成し、パンの商品価値を高めている。

*Saccharomyces* 属酵母種、特に *S. cerevisiae* は、古来より清酒・ワイン・ビールなどの各種アルコール飲料、そしてパン製造など多くの発酵食品製造に利用されてきた。パン製造の歴史は古く、紀元前 8000～7000 年頃にチグリス・ユーフラテス河流域一帯のメソポタミア地域で初めて人間によりパンの主原料である小麦が栽培され、紀元前 6000～4000 年頃に水に溶いた小麦粉を焼いて無発酵パンが作られたとされ、その後、紀元前 3500 年頃にナイル川河口の古代エジプトに小麦の栽培が伝わり、焼かずに置いておいたパン生地に付着していた野生酵母が発酵を行い、偶然的に発酵パンが誕生したとされている（ブーランジ

エリー フランセーズ ドンク, 2010)。この発酵パンの製造法が欧州へと伝わり、近代とほぼ変わらぬパン製造方法が開発され、20世紀に入り機械化の進展、そしてイーストの純粋培養の普及により製パンの合理化がなされている。中世においてはビールやワインの醸造に使用された酵母がパン製造に転用されていたために発酵力や保存性が不安定でパン自体の品質も不安定であったが、18世紀末より人為的な管理のもとでイーストが作られ、通気培養法・流加培養法の開発や廃糖蜜への原料転換により技術革新が進むことでイースト製造技術が確立され、品質が安定したことにより、高品質で安定したパンの製造に貢献している（田中・松本, 1992）。

前述したように、焼成されたパンのフレーバーの生成にはイーストの発酵による代謝産物が深く関与していることから、特徴的なフレーバーを作る香り成分高生産イーストなどが開発されている（田中・松本, 1992）。また、イーストで製造するパンとは異なる特殊な美味しさのパンを製造するために、製パン用ではない酒精用用途の酵母菌株や自然界から単離した野生酵母のほか、小麦粉に付着している酵母や乳酸菌を増殖・発酵させる「種起こし」を行った発酵種（パン種）を使用する例もある（井上, 2010）。

*Saccharomyces cerevisiae* AK46株は北海道十勝地方に自生するエゾヤマザクラ (*Cerasus sargentii*) のサクランボから分離された野生酵母であり、本菌株を用いて製造したパンには、フルーティで穏やかな特徴的な香味が付与されている。パンの主要原料である小麦と酵母が北海道産であり、地域特産品となるパンを創ることによる地域活性化に貢献するというコンセプトのもと、帯広畜産大学と北海道農業研究

センター（農研機構）の取り組みにより北海道十勝地方に自生する 200 点以上の果実、草花サンプルを分離源とした野生パン酵母菌株の分離が行われた。スクリーニングにより良好なアルコール発酵能を示した 8 株のなかで、最も優れた製パン性能を示した AK46 株が選抜され、本菌株は形態学・生理学的性質や rDNA の ITS 領域及び D1D2 領域の塩基配列に基づいて *S. cerevisiae* であると同定された（小田ら，2012）。その後、帯広畜産大学の取り組みにより国内機関で保有されている *S. cerevisiae* 菌株と共に *SUC2* 遺伝子の塩基配列解析が行われ、本菌株は遺伝学的にオリジナルな菌株であることが確認され、北海道十勝地方にイースト製造工場を有する日本甜菜製糖株式会社にて本菌株の製パン性能・培養性能・乾燥耐性が入念に検討・評価が行われた。最終的に、同社と帯広畜産大学でライセンス契約が締結され、平成 22 年から同社より「とがち野酵母®」の商品名で、本菌株の活性タイプのドライイースト製品が製造・販売されている（Fig. 1）。また、本菌株の実用化までの取り組みの過程は、産学官の連携により実用的にも学術的にも高く評価される業績を上げたと認められ、平成 23 年度日本食品科学工学会の技術賞（小田ら，2012）、平成 24 年度には社団法人農林水産食品産業技術振興協会会長賞を受賞している。

一般的に、野生酵母のマルトース代謝能は市販パン酵母菌株よりも弱いことが知られ（Bell *et al.*，2001）、*S. cerevisiae* AK46 株も同様に野生酵母としては希有な性質であるマルトースの発酵能を有しているが、市販されているパン酵母菌株と比較するとマルトースを加水分解する  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が弱くマルトースの発酵力が劣っている（Oda *et al.*，2010a）。パン製造においてマルトース発酵能は、



Fig. 1. 「とから野酵母<sup>®</sup>」ドライイースト製品

フランスパンのような砂糖を添加しない無糖生地や中種法で調製する中種を発酵させるために、小麦粉中の澱粉から $\beta$ -アミラーゼの作用により生じるマルトースを利用するためにパン酵母に求められる性能である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* がマルトースを代謝するためには、3種の遺伝子からなる *MAL* 遺伝子座 (*MAL\_1*、*MAL\_2*、*MAL\_3*) を有していなければならない (Charron *et al.*, 1989; Higgins *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2004)。各 *MAL* 遺伝子座はそれぞれ番号付けされており、各 *MAL* 遺伝子の「\_」にその番号が標記される。例えば、VII番染色体上の *MAL1* 遺伝子座の $\alpha$ -グルコシダーゼをコードする *MAL\_2* 遺伝子は *MAL12* と表される。*MAL* 遺伝子座は、二糖類であるマルトースごと細胞膜を透過させる *MAL\_1*: マルトース透過酵素 (パーミアーゼ)、細胞内にてマルトースを2分子のグルコースに分解する *MAL\_2*:  $\alpha$ -グルコシダーゼ (マルターゼ)、マルトース存在下でこれら2種類の酵素の発現を誘導する転写活性化因子としてはたらく *MAL\_3*: 転写活性化因子 (アクチベーター) の3遺伝子をコードしており、これら全てを有していなければマルトースを代謝することができない (Charron *et al.*, 1989; Novak *et al.*, 2004)。高い相同性配列を有している *MAL* 遺伝子座は *MAL1* (VII番染色体)、*MAL2* (III番染色体)、*MAL3* (II番染色体)、*MAL4* (XI番染色体)、*MAL6* (VIII番染色体) の全5種類存在する。各 *MAL* 遺伝子の配列から作製したプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション解析の結果から、*S. cerevisiae* およびその祖先種とされる *S. paradoxus* においてはVII番染色体上の *MAL1* 遺伝子座が原始配列であり、この遺伝子座が他の染色体へと転座することにより多重コピーを生じているとされており、加えて、*S. paradoxus* は

*MAL1* 遺伝子座のみを有する菌株が多い一方で、*S. cerevisiae* は複数の *MAL* 遺伝子座を有する菌株が多く存在しているとされている。この理由として、古来より発酵食品製造に利用されてきた *S. cerevisiae* 菌株のなかで、*MAL* 遺伝子座の転座により多重コピーを生じて優れたマルトース発酵力を持つようになった菌株が有位となる環境下での選択圧がかかってきたためと考えられている (Naumov *et al.*, 1994)。

*MAL* 遺伝子の発現はマルトースにより誘導されるとともに、グルコースおよびフルクトースの存在の有無により制御されている (大隅・下田, 2007)。酵母にとって効率の良い炭素源であるこれらの糖の存在下において、グルコース以外の炭素源の代謝に関与する酵素群のほか、糖新生・TCA サイクルなどの発現レベルが非常に低くなる、もしくは完全に発現が抑制される。この現象はカタボライト抑制 (グルコース抑制) として知られており、グルコースの存在量が少なくなるとカタボライト抑制が解除され、抑制された遺伝子群が発現されるようになる (大隅・下田, 2007)。カタボライト抑制には非常に多くの因子が関与しているが、その中でも Cys2His2 Zinc finger モチーフを有する DNA 結合タンパク質でリプレッサーとしてはたらく転写因子 Mig1、そして Ser/Thr プロテインキナーゼである Snf1 の 2 つが重要な因子となる (Gancedo, 1998)。グルコース存在下においては、Mig1 リプレッサーが遺伝子の制御領域に結合したのちに、コリプレッサーとしてはたらく Cyc8-Tup1 複合体と結合し、遺伝子発現が抑制される。グルコースの存在量が低下してくると、不活性型の Snf1 が活性化サブユニットである Snf4 によりリン酸化されて活性化し、活性型 Snf1 が Mig1 をリン酸化する。リン酸化されて活性化した Mig1 は Cyc8-Tup1 複合体と離

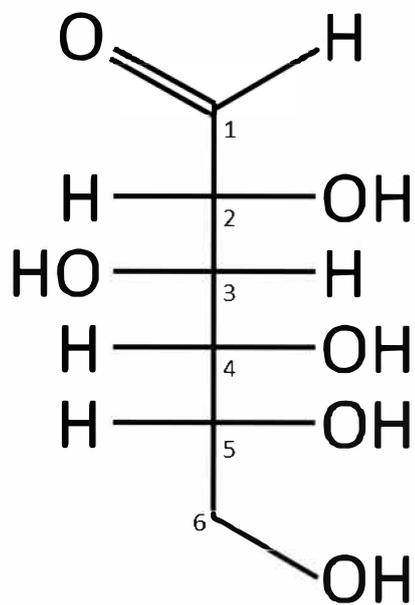
れて遺伝子の制御領域から外れて核外へと移され、遺伝子発現の抑制（カタボライト抑制）が解除される（大隅・下田, 2007）。これらの因子に働きかける更に下流の他因子として、グルコース存在下においてカタボライト抑制が誘起される際に、グルコースシグナルの伝達により SNF1 を脱リン酸化して不活性化し、カタボライト抑制に関与する酵母の調節タンパク質にも作用する Ser/Thr プロテインホスファターゼとしてはたらく Glc7-Reg1 複合体などが挙げられる (Gancedo, 1998)。他にも、グルコースやフルクトースをリン酸化するヘキソキナーゼタンパク質である Hxk2 はヘキソースリン酸化の触媒ドメインのほかにカタボライト抑制の調節ドメインを有しているとされている (Entian and Fröhlich, 1983)。グルコーストランスポーターである Hxt タンパク質はカタボライト抑制に通じるシグナル経路に関与しており、Hxt タンパク質 (Hxt1~Hxt7) の欠損株・高発現株を用いた解析から、カタボライト抑制は特定のトランスポータータンパク質に依存して誘起されないが、カタボライト抑制の程度はグルコースの取り込み能との相関があり、グルコースの利用率は関連するグルコースシグナルの強度によって決定されることが示唆されている (Gancedo, 1998)。Hxt2 と Hxt4 は低グルコース濃度のときのみ発現し、グルコースがないときには Rgt1 リプレッサーが DNA に結合して発現が抑制されており、グルコース存在下においては、そのグルコース濃度に応じたグルコースセンサータンパク質（低濃度：Snf3、高濃度：Rgt2）からのシグナル伝達により Grr1 がリプレッサーによる発現抑制を阻害することで、Hxt タンパク質が発現するようになる。また、高濃度のグルコース存在下においてはカタボライト抑制により、*HXT2* と *HXT4* の発現はこれらの

プロモーターに Mig1 が結合することで抑制される(大隅・下田, 2007)。

上記のように、カタボライト抑制には多くの要因の関与により誘導されているが、このカタボライト抑制に非感受性となることで、グルコース存在下においても他の糖類の代謝に関与する発現系が抑制されず代謝能の高まりが期待できる。2-デオキシグルコース(以下 2-DOG)は Fig. 2 に示すようにグルコースの 2 位の水酸基が水素に置換された構造アナログであり、グルコースと同様にカタボライト抑制を誘起するが、酵母は代謝することができないという特徴を有する。この 2-DOG に耐性を示し、2-DOG 存在下でも他の糖類を代謝するようになった菌株はカタボライト抑制に非感受性となっていることが期待される (Novak *et al.*, 1990; Randez-Gil and Sanz, 1994)。これまでに 2-DOG 耐性を付与することによりグルコースとマルトースを同時期に代謝できるようになった *S. cerevisiae* 変異株の取得が報告されているほか、パン酵母に 2-DOG 耐性を付与することにより、高糖生地での製パン性能が改善したと報告されている (Rincon *et al.*, 2001)。

本研究では、*S. cerevisiae* AK46 株を元株として 2-DOG 耐性が付与されたマルトース発酵力が向上した自然変異株を単離し、発酵力や酵素活性といった製パン性能に関与する性能を調査し、実際に製パン試験を実施した。加えて、元株 AK46 株と変異株の全ゲノム DNA を解析し、得られた配列情報からマルトース代謝に関わる遺伝子およびカタボライト抑制に関わる遺伝子の DNA・アミノ酸配列を比較することにより、マルトース発酵力向上の要因の解明を目指した。

Glucose



2-DOG

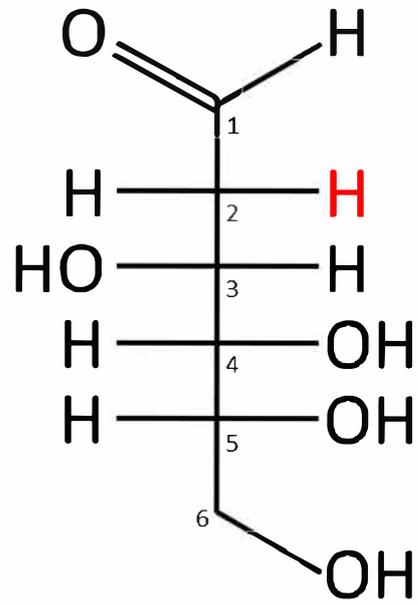


Fig. 2. グルコースと 2-デオキシグルコース (2-DOG) の構造

・ 2-DOG では、グルコース第 2 位の水酸基が水素に置換されている。

## II. 2-DOG 耐性株の取得・選抜

### 材料と方法

#### 1. 2-DOG 耐性株の分離

*Saccharomyces cerevisiae* AK46 のマルトース発酵力向上を目的として、2-デオキシグルコース（以下 2-DOG）耐性が付与された変異株の取得を試みた。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。

2-DOG 耐性株の取得に際し、*Kluyveromyces marxianus* に 2-DOG 耐性を付与し、ラクトースに対するカタボライト抑制非感受性株を取得した Oda and Nakamura (2009) の手法を参考としたが、*S. cerevisiae* は *K. marxianus* よりも 2-DOG に対する感受性が強い傾向がみられたため、2-DOG 濃度を参考文献値の 0.1% から下げて変異株取得を試みた。

*S. cerevisiae* AK46 を 10ml の YPD 培地（1.0% 酵母エキス、2.0% グルコース、2.0% ポリペプトン、pH5.5 : 50ml 容三角フラスコ・シリコン栓付）に接種し、旋回型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好気的に培養した。培養菌体を遠心分離により回収し、滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、最終的に 20ml の滅菌水にて再懸濁して酵母懸濁液を調製した。この酵母懸濁液 0.1ml を、0.08% の 2-DOG を含有するマルトースを糖源とした最少寒天培地（1.0% マルトース、0.67% Yeast Nitrogen Base

without amino acids、0.08% 2-DOG、2.0% 寒天) に接種し、30℃で10日間静置培養した。変異の固定を目的として、生育したコロニーを2-DOG濃度を0.09%に高めた2-DOG含有マルトース最少寒天培地に2回植え継ぎ、最終的に2-DOG濃度を0.10%とした2-DOG含有マルトース最少寒天培地に植菌し、2-DOG耐性株を取得した。

## 2. 2-DOG耐性株の選抜

上記手法にて取得した *S. cerevisiae* 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た。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。

YPD 培地 3ml (試験管) に YPD 寒天培地に生育させた菌体一白金耳分を接種し、往復型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。その後、培養液 0.6ml を YPS 培地 60ml (2.0% スクロース、4.0% Bacto™ ポリペプトン (Becton, Dickinson and company)、2.0% Bacto™ 酵母エキス (Becton, Dickinson and company)、3.0% NaCl、0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、300ml 容バツフル付三角フラスコ・シリコン栓付) に接種し、旋回型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。培養後の菌体を遠心分離により回収、蒸留水を用いて 2 回洗浄し、最終的に菌体を素焼き板に押し当てて脱水し、湿菌体を取得した。

湿菌体の重量と水分を測定し、菌体収量 (乾物 g/培地 L) を算出し 1 つ目の選抜指標とするとともに、2 つ目の選抜指標であるパン生地発酵力測定用として、湿菌体を用いて水分 67% (固形分 33%)・乾物 0.2g

／ml の濃度となるように菌体懸濁液を調製した。

パン生地発酵力は、パン生地を 30℃・3 時間インキュベートした際のガス発生量 (ml) と定義し、**Fig. 3** のような装置を用いて分析を実施した。小麦粉 10g に上記の酵母懸濁液 1ml と各種糖液 5.5ml を加え、スパチュラを用いて 1 分間混捏し、捏ね上げ温度が 30℃±1℃の範囲で調製した生地を長試験管に入れ、飽和食塩水を満たしたメスシリンダーに発生したガスを捕集し、その体積 (ml) を測定した。各試験区で 2 本ずつセットし、その平均値をパン生地発酵力として算出した。糖液の対粉スクロース含量を調整することで、各種パンの糖濃度を模した生地を調製し、適性を調査した。糖無添加の水を使用して調製した生地はフランスパン（無糖生地）、対粉 5% のスクロース糖液を使用して調製した生地は食パン（低糖生地）を想定している。培養試験は 3 回実施し、菌体収量・パン生地発酵力についてその平均値と標準偏差を算出し、t 検定を行い有意水準 5% での有意差を判定した。

### 3. グルコース存在下でのマルトースの消費量調査

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、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と考えられている。

AK46 由来 2-DOG 耐性株 MCD4 と元株 AK46 に加え、対照株として市販

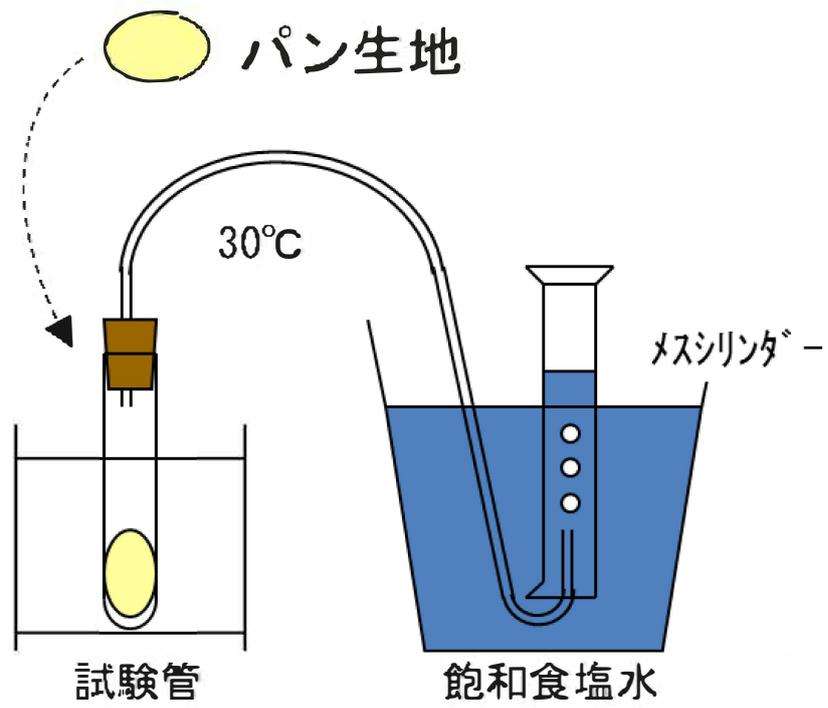


Fig. 3. パン生地発酵力測定用装置

パン酵母菌株分離株 HP216 を試験菌株として使用した。培養菌体は、2-DOG 耐性株の選抜時と同様の培養条件で取得した。乾燥菌体 1g 分の湿菌体を GM 培地 50ml (7.0% マルトース、1.0% グルコース、0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、200ml 容三角フラスコ・シリコン栓付) に接種し、旋回型振盪培養機にて 90rpm・30℃・3 時間振盪培養した。培養期間中に 30 分間隔で培地の一部をサンプリングし、遠心分離 (15000g・10 分間) により取得した上清を適宜希釈し、HPLC (LaChrom Elite、日立ハイテクサイエンス株式会社) を用いてマルトース、グルコースの糖濃度を測定し、糖消費の挙動を調査した。HPLC のカラムは Shodex KS-801 (昭和電工株式会社) を使用し、分離した糖は屈折率検出器にて検出した。

培養試験は 2 回実施し、培養時の残糖量の平均値を算出し、その推移を調査した。

## 結果と考察

### 1. 2-DOG 耐性株の選抜

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 耐性株として取得し、それぞれ MCD1~5 と命名した。これらの菌株を元株である AK46 とともに、YPS 培地での培養試験に供した。YPS 培地で培養した菌体の菌体収量、パン生地発酵力を測定した結果を **Table 1** に記載した。

培養試験の結果、MCD1、MCD2 そして MCD5 は菌体収量で AK46 よりも劣っていたために、選抜から除外した。MCD1 および MCD2 は 1 回目の培養試験で菌体収量に劣っていたために、培養は一回のみ行い、パン生地発酵力は実施しなかった。MCD5 は培養試験を 3 回実施して菌体収量が劣っていたために、パン生地発酵力は測定しなかった。

MCD3 と MCD4 は AK46 と同等の菌体収量を示し、これら 2 株を 1 次選抜株として、AK46 と共に、2 つ目の選抜指標である 2 種のパン生地発酵力の測定に供した。MCD3・MCD4 共に AK46 の各種パン生地発酵力を上回っており、製パン性能が高まっている可能性が示唆された。特に MCD4 は MCD3 よりも優れたパン生地発酵力を示し、特に糖無添加生地のパン生地発酵力が AK46 から 4 割ほど高まっていたことから、マルトース発酵力の顕著な高まりが期待された。以上から、MCD4 を AK46 由来 2-DOG 耐性株として選抜し、以降の試験に使用することとした。

**Table 1.** AK46 由来 2-DOG 耐性株の菌体収量とパン生地発酵力

菌株	菌体収量 (g dry wt / L)	パン生地発酵力 [CO <sub>2</sub> (ml) / 2h / 10g flour]	
		糖無添加生地	5%スクロース 含有生地
AK46	10.7±0.1 <sup>a</sup>	35.2±6.0 <sup>b</sup>	39.9±9.3 <sup>b</sup>
MCD1	4.1	N.D	N.D
MCD2	3.7	N.D	N.D
MCD3	10.3±0.6 <sup>a</sup>	43.9±6.7 <sup>a</sup>	50.8±2.9 <sup>a</sup>
MCD4	10.2±0.4 <sup>a</sup>	49.3±4.2 <sup>a</sup>	51.5±4.5 <sup>a</sup>
MCD5	8.9±0.4 <sup>b</sup>	N.D	N.D

- 分析値は 3 回反復した試験の平均値と標準偏差を記載している。
- MCD1 と MCD2 は試験を 1 回のみ実施した。
- 各分析値の右上の記号 (a, b) は、有意水準 5% で t 検定した際の有意差を表している。
- N. D. = Not Determined.
- 本表は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

## 2. グルコース存在下でのマルトースの消費量調査

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ことを確認するために、元株 AK46 と市販パン酵母分離株 HP216 と共に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分析し、その結果を **Fig. 4** にまとめた。

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。これら 2 株の培養中の糖消費はほぼ同一の挙動を示し、グルコースが存在していたことによりカタボライト抑制が誘起され、マルトース代謝が抑制されていたことが示唆された。

一方、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% 程度しか残存していなかった。以上の結果から、MCD4 はカタボライト抑制に対して非感受性となっており、グルコース存在下においてもマルトースの代謝が抑制されず、マルトース代謝能が高まっていることが示唆された。

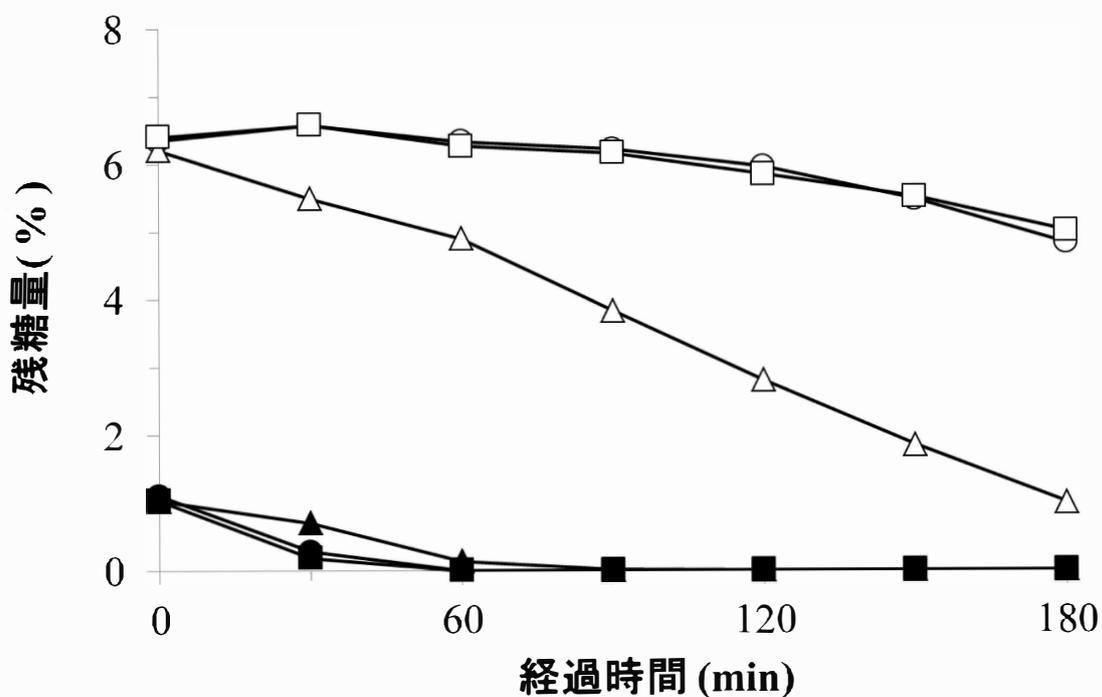


Fig. 4. 培地中のマルトースおよびグルコース濃度（残糖量）の推移

- ・ 分析値は 2 回反復した試験の平均値をプロットしている。
- ・ 白抜きシンボルと塗り潰しのシンボルは、それぞれマルトースとグルコースの残糖量 (%) を示している。

シンボル：○、●：AK46；△、▲：MCD4；□、■：HP216.

- ・ 本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

## 要約

*Saccharomyces cerevisiae* AK46 のマルトース発酵力向上を目的として、AK46 を元株として 2-DOG 耐性株全 5 株 (MCD1~4) を取得し、これらの菌株を培養試験に供し、試験菌株の選抜を試みた。

培養菌体の菌体収量と各種パン生地発酵力を選抜指標として、AK46 と同等の菌体収量を有し、糖無添加生地のパン生地発酵力が AK46 から 4 割程度強化されていた MCD4 を選抜し、以降の試験に使用することとした。

MCD4 がカタボライト抑制に非感受性となっているかを確認するために、マルトースとグルコースを含む GM 培地で培養した際の糖消費の挙動を調査した。AK46 と市販パン酵母分離株 HP216 はグルコースを消費した後にマルトースの消費が始まり、カタボライト抑制が誘起されてマルトース代謝が抑制されていた。一方、MCD4 はグルコース存在下においてもマルトースを同時期に消費していたことから、カタボライト抑制に対して非感受性となっており、マルトースの代謝能が高まっていることが示唆された。

### Ⅲ. 2-DOG 耐性株 MCD4 の性能調査

#### 材料と方法

##### 1. 培養菌体の取得

製パンに関係する酵素活性や発酵力、製パン性能を調査に使用するために、下記手法にて培養菌体を取得した。

YPD 培地 10ml (試験管) に YPD 寒天培地に生育させた菌体一白金耳分を接種し、往復型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。その後、培養液全量を YPS 培地 120ml (500ml 容振盪フラスコ、シリコン栓付) に接種し、往復型振盪培養機にて 100rpm・30℃・40 時間好氣的に培養した。培養後の菌体を遠心分離により回収、蒸留水を用いて 2 回洗浄し、最終的に酵母懸濁液を調製して菌体収量 (乾物 g / 培地 L) を算出した。

各種試験は Lot が異なる培養菌体を用いて 3 回実施し、分析値の平均値と標準偏差を算出するとともに、t 検定を行い有意水準 5% での有意差を判定した。

##### 2. 液体発酵力測定 (F10 液体発酵力、M8 液体発酵力)

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、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。

乾物濃度 200mg/5ml の菌体懸濁液を調製し、菌体懸濁液 5ml を各種液体発酵力培地 20ml（糖源として F10 では 10%スクロース・M8 では 8.0%マルトース、他成分として 0.3% NaHPO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.2% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.08% KCl、1.25% L-アスパラギン酸一水和物、0.002% 塩酸チアミン、0.02% ニコチン酸、0.002% 塩酸ピリドキシン：100ml 容三角フラスコ）に接種後、7.2N 硫酸を注いだマイセル氏発酵管をセットし発酵前の重量を測定し、往復型振盪培養器にて 30℃・80rpm で 3 時間培養した。マイセル氏発酵管中の硫酸が糖類を発酵することで生じる水をトラップすることにより、発酵により生じる炭酸ガス発生に伴う重量減少量を測定することができる。発酵後の重量を測定し、発酵前後の重量減少値を算出した。

### 3. 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、Oda *et al* (2010a) の手法を改変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（ $\beta$ -D-フルクトフラノシダーゼ）はスクロースのフルクトースを認識して、 $\beta$ -フルクトシド結合を加水分解してグルコースとフルクトースを生じる反応を触媒しており、この反応で生じるグルコース・フルクトースを転化糖（Invert Sugar）と呼ぶためにインベルターゼと呼ばれている。*S. cerevisiae* において、インベルター

ぜは細胞壁成分であるマンナンと結合して局在している（柳島ら, 1981）。スクロースはインベルターゼによって加水分解されたのちに菌体内に取り込まれて代謝される。製パンにおいては、無糖生地の発酵序盤にて主要発酵糖類となる小麦粉中のグルコフルクタンなどのフルクトシドの加水分解や、食パン・菓子パンなどの原材料に砂糖を含んだ低糖・高糖生地におけるスクロースの分解に関与している（田中・松本, 2008）。

インベルターゼ活性は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（以下 DNS）との加熱反応による色調変化を分光高度計にて定量した。DNS を強アルカリ性下にて還元糖を加熱反応させることで DNS の 3 位のニトロ基がアミノ基となり、赤色の 3-アミノ-5-ニトロサリチル酸を生じるため、これを分光高度計にて比色定量を行うことにより還元糖の定量が可能となる。

インベルターゼ活性測定に用いる酵素液として、酵母懸濁液を使用した。酵素液 1.0ml を、基質液（5.0% スクロースを含有する 0.1M クエン酸緩衝液 pH5.5）1.0ml に加え、30℃で 3 分間インキュベートし、1N NaOH 2.0ml を加えて反応を停止させた。反応液を遠心分離に供して上清 1.0ml を取得し、発色試薬（1.0%DNS、1.7% NaOH、30%酒石酸ナトリウムカリウム・四水和物）1.0ml と混和した後に 100℃・5 分間加熱した。加熱後に氷冷し、脱塩水 10ml を加え、分光光度計により 540nm の吸光度を測定し、生成した還元糖を定量した。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。

$\alpha$ -グルコシダーゼは糖類の  $\alpha$ -グリコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素であり、グルコース 2 分子が  $\alpha$ 1-4 グリコシド結合で繋がっているマルトースを分解するマルターゼもこの酵素に該当する。*S. cerevisiae* はマルトースを菌体内に取り込んだ後、 $\alpha$ -グルコシダーゼにより加水分解して代謝する。製パンにおいては、フランスパンのような砂糖を添加しない無糖生地や、中種法で調製する中種において小麦粉中の澱粉から  $\beta$ -アミラーゼの作用により生成するマルトースを利用するために非常に重要な酵素である(田中・松本, 1992)。

$\alpha$ -グルコシダーゼは菌体内酵素であるため、Oda et al., (2010a) ではクロロホルムと SDS による菌体内酵素を溶出させて粗酵素液を取得しているが、本試験では超音波処理により菌体を破砕した後に 0.2  $\mu$ m フィルターで濾過し、酵素活性測定に用いる粗酵素液を取得した(Suzuki and Tamura, 1984)。超音波処理は、酵母懸濁液を超音波発生機(UD-201、微量チップ使用、株式会社トミー精工)にセットし、氷冷しながら 80W (出力レベル 5) で 10 分間処理して実施した。

$\alpha$ -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。粗酵素液 0.5ml を基質液 (10mM *p*-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコピラノシド) 0.5ml に加え、25°C で 3 分間インキュベートし、0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5ml を加えて反応を停止させ、分光光度計により 410nm の吸光度を測定し、遊離した *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。

#### 4. 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、Fermograph II（アトー株式会社）を用いて、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。

砂糖を添加しない生地（無糖生地）からの発酵力を、無糖生地発酵力として測定した。無糖生地からの発酵においては、発酵開始 1 時間目までに、小麦粉中に存在する微量のグルコース・フルクトースのほか、グルコフラクタンやラフィノースがインベルターゼにより加水分解されて生じる単糖を発酵することによる炭酸ガスのピークが発酵開始 1 時間目ほどにみられる。その後、マルトース発酵能を有している酵母菌株では、その後に小麦粉中の小麦粉中の澱粉から  $\beta$ -アミラーゼにより生成するマルトースを発酵することにより生じる炭酸ガスの大きなピークを生じる（田中・松本，1992；2008）。マルトースの発酵が単糖類の発酵から遅れて行われる理由として、グルコース存在下においてカタボライト抑制が誘起されて酵母のマルトース取り込み機構の発現が抑制されるため、グルコースが低濃度になるまではマルトース発酵が開始しないこと、また、小麦粉中にマルトースが僅かにしか存在せず、生地を混捏することにより小麦粉中の  $\beta$ -アミラーゼの作用によりマルトースを生じるまでに時間を要することが挙げられる（田中・松本，1992；2008）。

小麦粉（日清カメリヤ、日清製粉株式会社）100g、培養菌体（水分 66%）2.86g、水 57.1ml をミキサーにセットし、捏ね上げ温度が 28℃ となるように調整しながら 2 分間混捏した。混捏後に生地 40g を 2 分取し、それぞれをインキュベーターで加温していた測定瓶に入れ、

Fermograph II の使用法に則り炭酸ガス発生量の測定を実施した。各菌株 2 つのサンプルで測定を行い、その平均値を分析値として 5 分間毎のガス発生量と、その値を加算してトータルガス発生量を算出した。

また、製パン試験を実施に併せて、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。

## 5. 製パン試験（中種法）

試験菌株の製パン性能を調査するにあたり、3 種の製パン法にて性能を調査した。1 つ目の製パン法である中種法は、製パン原料として使用する小麦粉の一部と水、イーストなどで中種を混捏し、中種発酵を行うことが最大の特徴である。中種発酵を行うことで、生地膨張やエタノール・有機酸の蓄積によりグルテン凝集物の伸展性が高まり、本捏時のミキシングにおける生地のフルディベロップメントを容易に達成できることから、本捏生地の気泡数も多く生地の柔軟性も高い。このように中種法で調製した伸展性・柔軟性が高い生地は、製パン時の生地の損傷度が大きい機械化製パンに対する耐性（機械耐性）が高く、工場にて大型の自動分割機（ディバイダー）・自動丸め機（ラウンダー）・モルダーなどの機械を用いてパンを合理的に大量生産する大手ホールセールベーカリーでの主製法として用いられている（井上，2010）。また、中種発酵中での香気成分の蓄積や、小麦粉を含む原料由来の酵素の働きによりマルトース・遊離アミノ酸・遊離ペプチドを生じることにより、パンの焼き色や風味が高まる。更に、気泡数が多く伸展性・柔軟性が高いので焼成時の釜伸びが大きく、パンの気泡膜は

薄くきめ細やかになり、パンの老化が遅くなり嗜好性が失われにくいという特徴をもつ。

製パン原材料使用量はベーカースパーセント（以下 BP）を用いて表記した。小麦粉（イーグル、日本製粉株式会社）70%、培養菌体 2%、イーストフード（オリエンタル酵母工業）0.1%、水 40%をミキサー（5DM-03-r、株式会社ダルトン）にセットし、捏ね上げ温度が 28℃となるように調整しながら低速で 2 分混捏して中種を調製した。生地発酵力測定用に生地の一部を分取したのちに、温度 28℃で 4 時間発酵させた。中種発酵後に、中種、小麦粉 30%、砂糖 5%、食塩 2%、脱脂粉乳 2%、水 25%をミキサーにセットして低速で 2 分、ショートニング 5%を加えた後に低速 1 分、その後高速で 3~4 分混捏して本捏し、捏上温度が  $27.5 \pm 0.5$ ℃でフルディベロップされた本捏生地を調製した。本捏生地からも生地発酵力測定用に生地の一部を分取したのちに、フロアタイムとして温度 28℃で 20 分間発酵させた後に 450g となるように生地を分割し、ベンチタイムとして 28℃で 20 分間発酵させた。その後、モルダー（WF、株式会社押切機械製作所）を通して成形して焼き型に移し、ホイロタイムとして 38℃・湿度 85%で 55 分間発酵させた。ホイロタイム後に焼き型ごとリールオーブン（KS8-4-8、株式会社櫛澤電気製作所）に移して 200℃・25 分間焼成してパンを調製した。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、製パン性能の評価項目とした。

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。

## 6. 製パン試験（ストレート法）

2 つ目の製パン法であるストレート法（直捏法）は、中種法とは異なり、全製パン原材料が一度に混捏されてパン生地を調製する基本的な方法である。この製法で焼成したパンは、発酵による香気成分・呈味成分と原材料の個性が活かされた風味の良いパンができる。一方、パンの膨張は中種法には及ばず、ミキシングの程度が低いため気泡数が少なく気泡膜が厚いため、グルテン凝集物の伸展性・柔軟性が低く機械耐性が低い、気泡膜が厚いことから老化の進行が早いという短所を有するために、ホールセールベーカリーでの大量生産には使用が難しい手法とされている（井上，2010）。

小麦粉 100%、培養菌体 2%、イーストフード 0.1%、砂糖 5%、食塩 2%、脱脂粉乳 2%、水 72%をミキサーにセットし、低速で 2 分、高速で 2 分混捏後にショートニング 5%を加える。低速 1 分、高速 4 分混捏して、捏上温度が  $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  で本捏生地を調製した。本捏生地から生地発酵力測定用に生地の一部を分取したのちに、フロアタイムとして温度  $28^{\circ}\text{C}$  で 90 分間発酵させ、30 分後にパンチ（ガス抜き）を行った。発酵後に 450g となるように生地を分割し、ベンチタイムとして  $28^{\circ}\text{C}$  で 25 分間発酵させた。その後、モルダーを通して成形して焼き型に移し、ホイロタイムとして  $38^{\circ}\text{C}$  ・湿度 85% で 55 分間発酵させた。ホイロタイム後に焼き型ごとリールオーブンに移して  $215^{\circ}\text{C}$  ・20 分間焼成してパンを調製した。焼成したパンの容積（ml）と重量（g）を測定して比容積（ml/g）を算出し、製パン性能の評価項目とした。

ストレート法では本捏生地の生地発酵力を測定した。発酵時間は混捏後の発酵工程の所要時間と同一とした。

## 7. 製パン試験（ノータイム法）

3 つ目の製パン法であるノータイム法はストレート法から派生して考案された手法であり、発酵工程の極端な短縮・省略により製パン所要時間の大幅な合理化を図っていることが特徴である。本法もストレート法と同様に、全製パン原材料が一度に混捏されてパン生地を調製するが、発酵時間の極端な短縮に伴う生地熟成不足を補うために、ストレート法と比較してイースト配合量・アスコルビン酸などの酸化剤添加量を増量し、ミキシングの程度を高めることによりグルテン凝集物の伸展性・柔軟性を十分に高め、更に捏上温度を高くすることが必要となる（井上, 2010）。ノータイム法で調製した生地は、ミキシングの程度が高められているために気泡数が多く気泡膜が薄いため機械耐性が高く、焼成したパンの容積もストレート法と比較すると大きくなる。一方、焼成したパンの風味は発酵工程の短縮・省略により風味は非常に乏しくなっているという欠点がある。

小麦粉 100%、培養菌体 4%、イーストフード 0.15%、モルトエキス 0.4%、砂糖 4%、食塩 2.2%、脱脂粉乳 5%、水 69%をミキサーにセットし、低速で 2 分、高速で 3 分混捏後にショートニング 6%を加える。低速 2 分、高速 5.5 分混捏して、捏上温度が  $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  でフルディベロップされた本捏生地进行調製した。本捏生地から生地発酵力測定用に生地の一部を分取したのちに、フロアタイムとして温度  $28^{\circ}\text{C}$  で 20 分間発酵させ、発酵後に 450g となるように生地を分割し、ベンチタイムとして  $28^{\circ}\text{C}$  で 20 分間発酵させた。その後、モルダーを通して成形して焼き型に移し、ホイロタイムとして  $38^{\circ}\text{C}$  ・湿度 85% で 55 分間発酵させた。ホイロタイム後に焼き型ごとリールオープンに移して  $200^{\circ}\text{C}$  ・25 分間

焼成してパンを調製した。焼成したパンの容積 (ml) と重量 (g) を測定して比容積 (ml/g) を算出し、製パン性能の評価項目とした。

ノータイム法では本捏生地の生地発酵力を測定した。発酵時間は混捏後の発酵工程の所要時間と同一とした。

## 結果と考察

### 1. 培養菌体の取得

YPS 培地を用いて振盪培養を行ったときの菌体収量を算出し、培養菌体を用いて測定した各酵素活性、液体発酵力の分析結果と共に **Table 2** に記載した。

MCD4 の菌体収量は元株 AK46 および市販パン酵母分離株 HP216 と同等の水準であり、MCD4 は市販パン酵母に匹敵する良好な増殖性能を有していることが示唆された。

### 2. 液体発酵力測定 (F10 液体発酵力、M8 液体発酵力)

試験菌株の各種製パン性能を簡易的に評価するために、スクロースを糖源として低糖生地を想定した F10 液体発酵力、マルトースを糖源として無糖生地を想定した M8 液体発酵力を測定した。MCD4 の F10 液体発酵力は AK46 よりも僅かに優れていたが、HP216 には及ばなかった。一方、MCD4 の M8 液体発酵力は AK46 の約 3.8 倍、HP216 の約 2.3 倍となり試験菌株の中で最も優れた値を示していた。

### 3. 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と、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。

AK46 はインベルターゼ活性が低いという特徴を有しているが、AK46 を元株として取得した変異株である MCD4 のインベルターゼ活性も

**Table 2.** パン酵母菌株に求められる諸性能の比較

菌株	菌体収量 (g dry wt / L)	液体発酵力 (decrease in weight (g))		酵素活性 (U / mg dry wt of cell)	
		F10	M8	$\alpha$ -Glucosidase	Invertase
AK46	10.1±0.4 <sup>a</sup>	279.2±13.4 <sup>a</sup>	29.3±3.8 <sup>a</sup>	28.7±0.7 <sup>a</sup>	4.4±1.4 <sup>a</sup>
MCD4	10.4±0.4 <sup>a</sup>	312.5±13.7 <sup>b</sup>	111.1±8.2 <sup>c</sup>	45.1±4.8 <sup>b</sup>	4.2±2.0 <sup>a</sup>
HP216	10.7±0.1 <sup>a</sup>	437.1±13.4 <sup>c</sup>	48.7±4.9 <sup>b</sup>	24.3±4.2 <sup>a</sup>	74.2±10.6 <sup>b</sup>

- ・分析値は3回反復した試験の平均値と標準偏差を記載している。
- ・各分析値の右上の記号（a, b, c）は、有意水準5%でt検定した際の有意差を表している。
- ・本表は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

AK46 と同水準の低い値を示した。一方、HP216 は AK46 および MCD4 よりも顕著に高いインベルターゼ活性を示した。

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性においては、MCD4 は AK46 の約 1.6 倍、HP216 の約 1.9 倍となり、試験菌株の中で最も高い値を示した。元株からの  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりが、MCD4 のマルトース発酵力が顕著に高まっている要因の 1 つであることが示唆された。

インベルターゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼは製パン性能に重要な酵素であることはよく知られているが、一概に酵母の製パン性能はこれらの酵素活性で決定されるわけではなく、特に、インベルターゼ活性は高糖生地中における酵母の耐糖性と負の相関があることが報告されている（佐藤友太郎，1966）。インベルターゼ活性が高い酵母は、スクロースが加水分解された際に酵母の周囲環境の浸透圧が高まり、酵母自体の発酵が強く抑制されていると考えられている。

#### 4. 生地発酵力（無糖生地発酵力）

MCD4 のマルトース発酵力が高まっていたことを受け、実際に培養菌体と小麦粉を混捏して無糖生地进行を調製し、Fermograph II を用いて生地中の糖類を発酵することにより生じる炭酸ガス発生量を測定した（Fig. 5）。

インベルターゼ活性の高い HP216 は、発酵開始 1 時間目ほどまでに現れる小麦粉内に生じた単糖類を発酵することにより生じる 1 つ目のピークのほかに、その後にマルトースの発酵により生じる 2 つ目の大きなピークがみられ、二山形のピークとなっていた。インベルターゼ活性の低い AK46 には 1 つ目のピークはほぼ見られず、マルトースを発

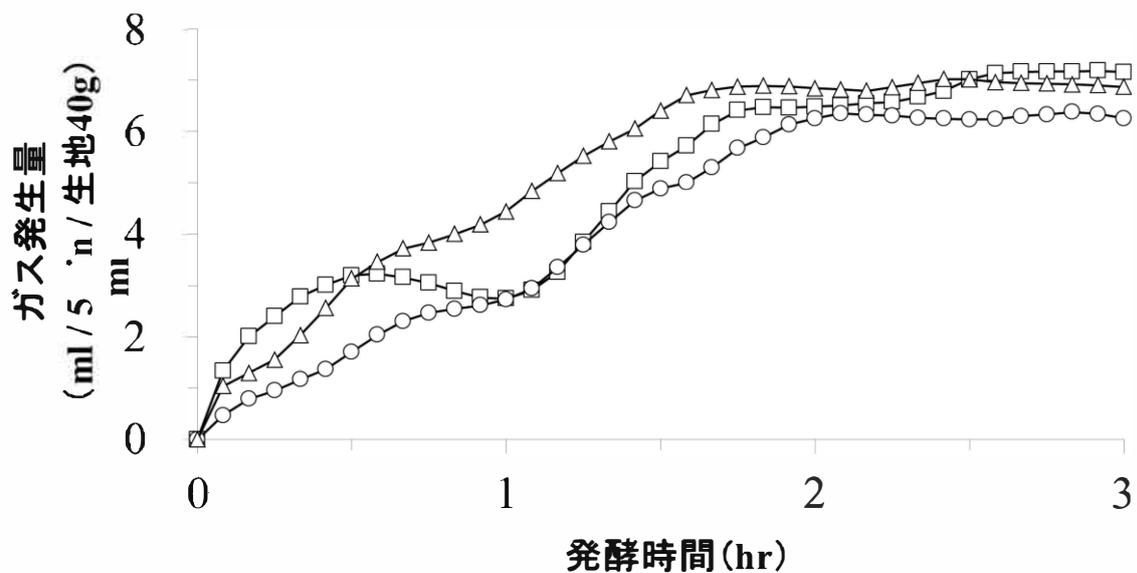


Fig. 5. 無糖生地発酵力（5分間毎のガス発生量推移）

- 1回の試験で菌株毎に生地を2つ調製して5分間毎のガス発生量を測定し、この平均値を試験1回分の分析値とした。独立した試験3回分の分析値から平均値を算出し、これをプロットしてグラフを描画した。

シンボル：○、AK46；△、MCD4；□、HP216.

- 本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

酵することによる 2 つ目のピークしかみられなかった。AK46 と同様にインベルターゼ活性の低い MCD4 にも 1 つ目のピークはほぼ見られないが、2-DOG 耐性の付与によりグルコース存在下でもマルトースを代謝できるようになっているためか、2 つ目のマルトース発酵によるピークが早く訪れており、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、HP216 と同程度の値を示した (AK46 : 21.2ml、MCD4 : 35.3ml、HP216 : 32.6ml)。また、測定期間 (3 時間) ではトータルガス発生量は継続して AK46 を上回り、トータルガス発生量は約 25% 増となっていた (AK46 : 154.8ml、MCD4 : 193.0ml、HP216 : 178.2ml)。

小田・大内 (1989a) は  $\alpha$ -グルコシダーゼと糖を添加しない無糖生地発酵力に正の相関があると報告しているが、本試験の結果では、AK46 は HP216 と同水準の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を有しているにも関わらず、無糖生地における AK46 のトータルガス発生量 (3 時間経過後) と M8 液体発酵力は HP216 よりも低い値を示した。この理由として、マルトース発酵能が  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性のみではなく、マルトースを菌体内に取り込むマルトースパーミアーゼや、マルトース代謝における解糖系の代謝活性にも影響を受けているためであると推察された。

## 5. 製パン試験 (中種法)、生地発酵力 (中種、本捏生地)

2-DOG 耐性の付与によりマルトース発酵力が向上した MCD4 が、製パン性能が向上して実用的性能が高まっているかを調査する為に、3 種の主要な製パン法にて製パン試験を実施した。

各製パン法の工程中の生地における発酵性能を調査する為に、製パ

ン工程中の生地を一部分取し、Fermograph II を用いて生地発酵力を測定した。中種法では、中種と本捏生地の 2 種類の炭酸ガス発生量を生地発酵力として測定し、5 分間毎の炭酸ガス発生量を **Fig. 6** に示した。

中種はイーストフードが原料に含まれている以外は無糖生地と同一の組成であることもあり、無糖生地発酵力測定時とほぼ同様の挙動を示し、MCD4 は 2-DOG 耐性の付与により 2 つ目のマルトース発酵によるピークが早く訪れ、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 1.6 倍となり市販パン酵母菌株の HP216 とほぼ同等であった (AK46 : 21.9ml、MCD4 : 34.8ml、HP216 : 33.3ml)。また、中種発酵の所要時間 (4 時間) の間、トータルガス発生量において MCD4 は AK46 を終止上回っており、HP216 とほぼ同等の性能を示した (AK46 : 259.7ml、MCD4 : 294.8ml、HP216 : 296.0ml)。

中種発酵を終えた中種に砂糖等の製パン原料を混捏して調製した本捏生地からの 5 分間毎の炭酸ガス発生量を調べると、MCD4 は HP216 には及ばないものの AK46 よりも発酵力が高く推移し、本捏後のフロアタイム (90 分) 終了後の MCD4 のトータルガス発生量は AK46 よりも高くなっていた。(AK46 : 68.6ml、MCD4 : 74.4ml、HP216 : 76.4ml)

全 3 種類の製法にて実施した製パン試験の結果を、**Table 3** に纏めて記載した。また、中種法にて焼成したパンの断面写真を **Fig. 7** に示した。中種法での製パン試験にて焼成したパンの比容積は、MCD4 は AK46 から顕著に向上しており、市販パン酵母分離株 HP216 とほぼ同等にまで製パン性能が高まっていた。Oda *et al* (2010a) では当研究と同様に AK46 と HP216 を用いて中種法での製パン試験を実施しており、AK46 の製パン性能を HP216 に近づけるために AK46 のイーストの使用

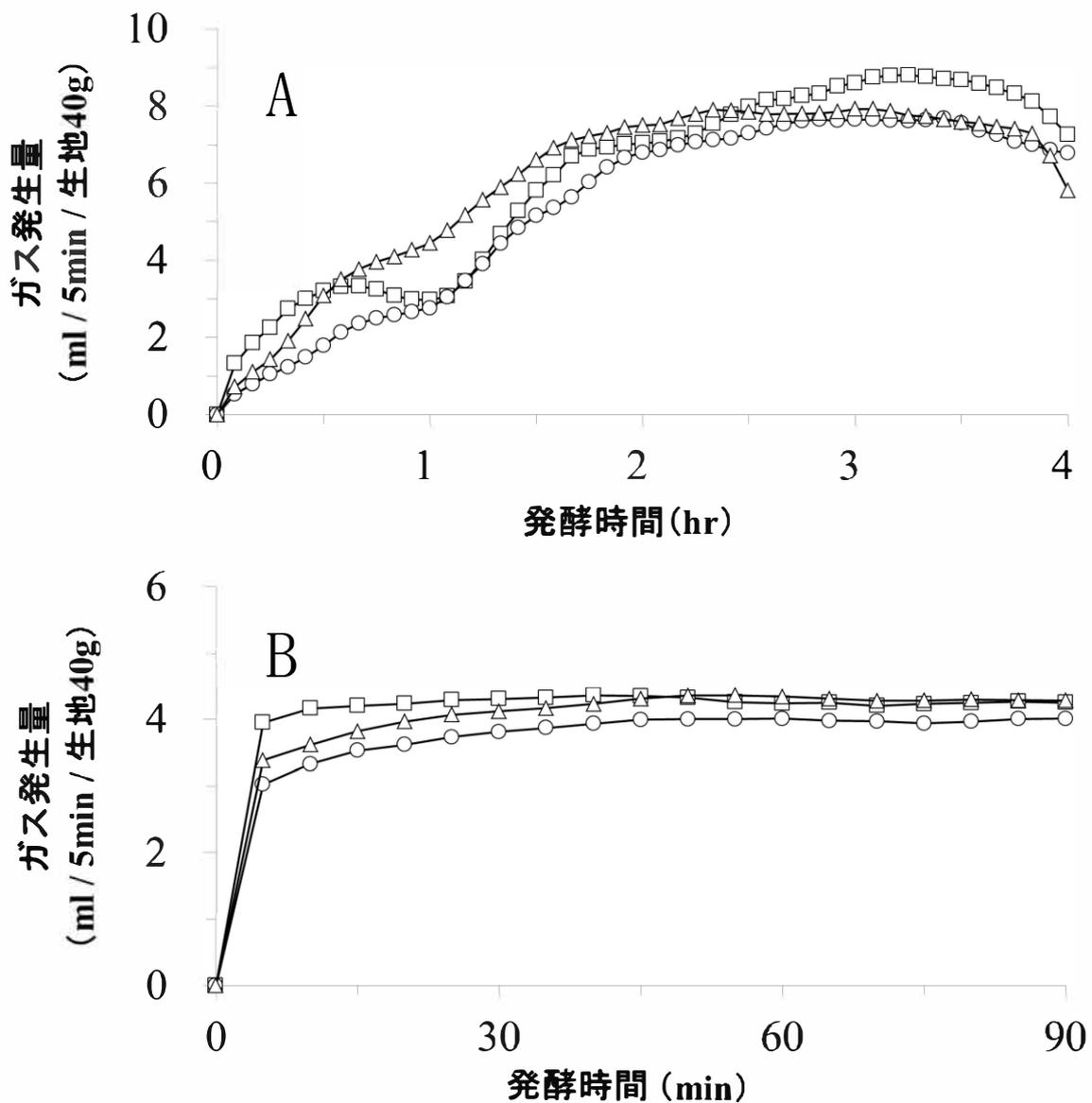


Fig. 6. 中種法における各工程での生地発酵力

- 1回の試験で菌株毎に生地を2つ調製して5分間毎のガス発生量を測定し、この平均値を試験1回分の分析値とした。独立した試験3回分の分析値から平均値を算出し、これをプロットした。

A: 中種 ; B: 本捏生地

シンボル : ○、AK46 ; △、MCD4 ; □、HP216.

- 本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

**Table 3.** 各製パン法での製パン性能評価

製パン法	菌株	容積 (ml) (A)	重量 (g) (B)	比容積 (A / B)
中種法	AK46	2035.4±66.9	400.8±8.3	5.08±0.06 <sup>a</sup>
	MCD4	2143.2±44.8	397.1±7.3	5.40±0.09 <sup>b</sup>
	HP216	2124.9±40.5	399.2±9.0	5.32±0.10 <sup>b</sup>
ストレート法	AK46	1861.9±43.2	408.1±0.2	4.56±0.10 <sup>c</sup>
	MCD4	1865.0±49.2	407.8±0.8	4.57±0.13 <sup>c</sup>
	HP216	2343.4±19.6	401.1±1.2	5.84±0.06 <sup>d</sup>
ノータイム法	AK46	1892.2±84.1	399.9±3.8	4.73±0.25 <sup>e</sup>
	MCD4	2025.3±18.7	397.3±4.1	5.10±0.07 <sup>e</sup>
	HP216	2330.1±20.2	391.2±4.7	5.96±0.10 <sup>f</sup>

- ・分析値は3回反復した試験の平均値と標準偏差を記載している。
- ・各分析値の右上の記号 (a, b, c, d, e, f) は、有意水準5%でt検定した際の有意差を表している。
- ・本表は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

AK46

MCD4

HP216



Fig.7. 中種法で焼成したパンの断面図

・本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

量を標準から 1.2 倍に高めて製パン試験を実施しているが、それでも焼成したパンの比容積は HP216 には及ばなかった。当研究の結果では、MCD4 は HP216 とイースト使用量が等量でも、パンの比容積は同等であったことから、2-DOG 耐性が付与されてマルトース発酵力が向上したことにより、マルトース発酵過程を含む中種法での製パン性能が向上したと考えられる。

#### 6. 製パン試験（ストレート法）、生地発酵力（混捏生地）

ストレート法では、混捏生地からの炭酸ガス発生量を生地発酵力として測定し、5 分間毎の炭酸ガス発生量を **Fig. 8** に示した。

市販パン酵母分離株である HP216 が混捏後からフロアタイムが終了する 90 分の間、継続して AK46 および MCD4 よりも顕著に優れた発酵力を示し、トータルガス発生量もこれを反映して飛び抜けて高い値を示した（AK46：42.1、MCD4：39.9、HP216：66.4ml）。MCD4 は 30 分目までは AK46 よりも高い値を示していたが、以降は AK46 のほうが優れた発酵力を示し、トータルガス発生量も AK46 が僅かに高い値を示していた。

ストレート法で焼成したパンの断面写真を **Fig. 9** に示した。ストレート法での製パン試験にて焼成したパンの比容積は、生地発酵力の傾向と同様に、HP216 が顕著に優れていた。MCD4 と AK46 の比容積はほぼ同等であり、ストレート法においては 2-DOG 耐性付与による製パン性能の向上はみられなかった。

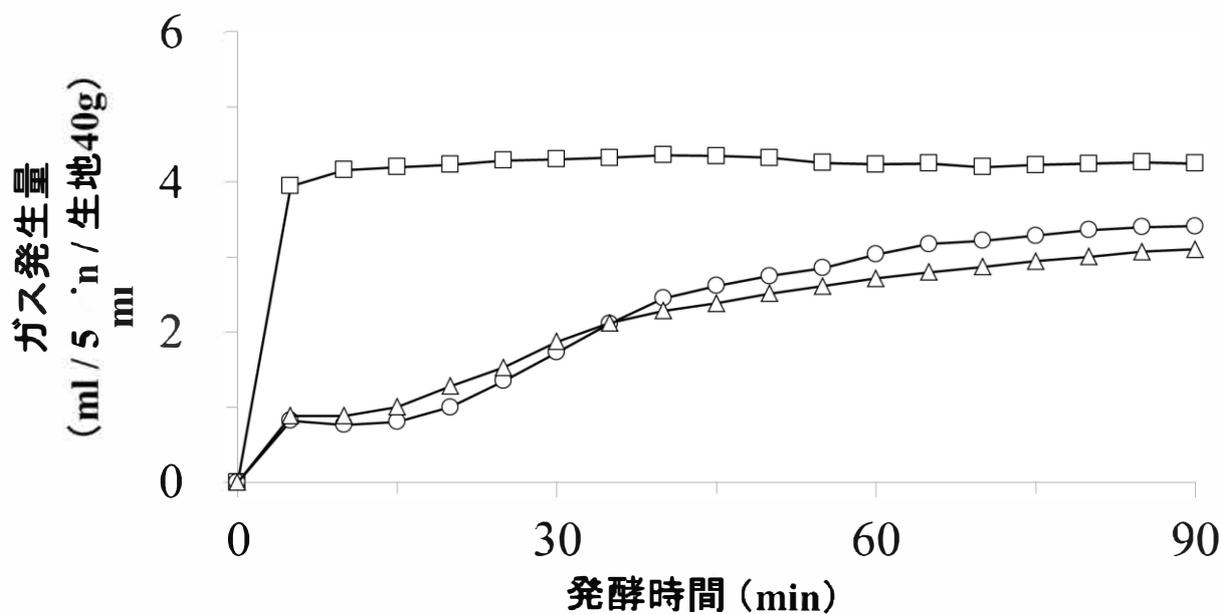


Fig. 8. ストレート法における本捏生地での生地発酵力

- ・ 1回の試験で菌株毎に生地を2つ調製して5分間毎のガス発生量を測定し、この平均値を試験1回分の分析値とした。独立した試験3回分の分析値から平均値を算出し、これをプロットした。

シンボル：○、AK46；△、MCD4；□、HP216.

- ・ 本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

AK46

MCD4

HP216



Fig. 9. ストレート法で焼成したパンの断面図

・本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

## 7. 製パン試験（ノータイム法）、生地発酵力（混捏生地）

ノータイム法では、ストレート法と同様に混捏生地からの炭酸ガス発生量を生地発酵力として測定し、5 分間毎の炭酸ガス発生量を **Fig. 10** に示した。

ストレート法の結果と同様に、市販パン酵母分離株である HP216 が混捏後からフロアタイム終了までの 20 分間、継続して AK46 および MCD4 よりも顕著に優れ、トータルガス発生量も高い値を示した（AK46 : 11.9ml、MCD4 : 13.7ml、HP216 : 23.9ml）。MCD4 は AK46 よりも僅かに発酵力が高く、トータルガス発生量も若干高い値を示していた。

ノータイム法で焼成したパンの断面写真を **Fig. 11** に示した。ストレート法での製パン試験時と同様に、ノータイム法にて焼成したパンの比容積は、生地発酵力の傾向と同様に HP216 が顕著に優れていた。有意差はないものの MCD4 の比容積は AK46 よりも若干高い値を示した。

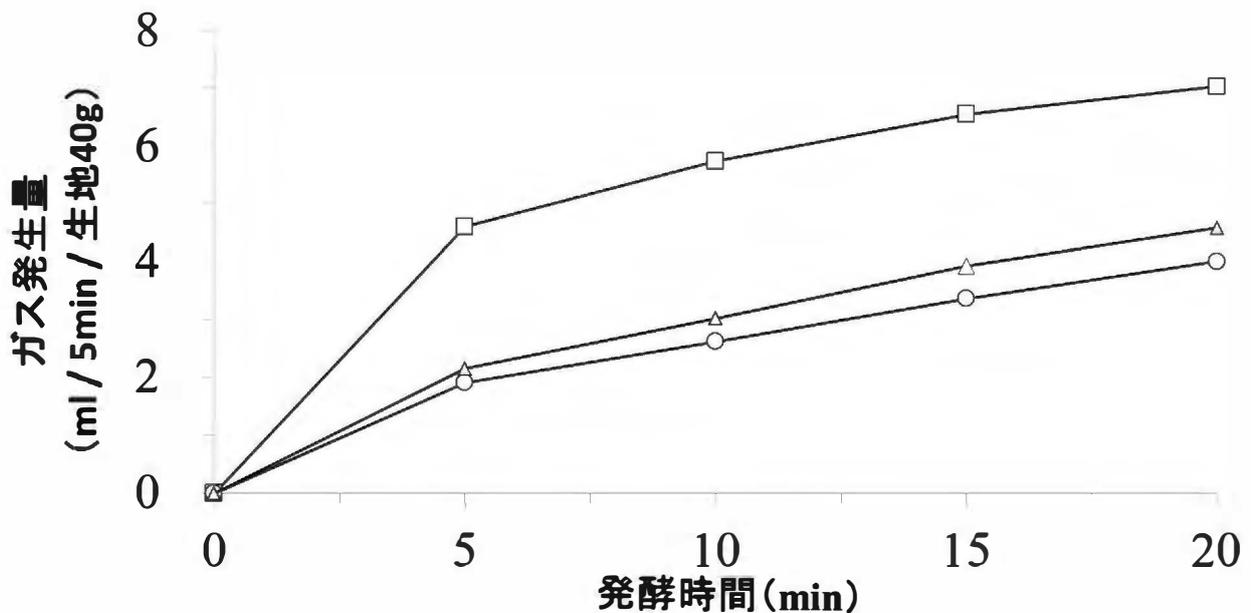


Fig. 10. ノータイム法における本捏生地での生地発酵力

- ・ 1回の試験で菌株毎に生地を2つ調製して5分間毎のガス発生量を測定し、この平均値を試験1回分の分析値とした。独立した試験3回分の分析値から平均値を算出し、これをプロットした。

シンボル：○、AK46；△、MCD4；□、HP216.

- ・ 本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

AK46

MCD4

HP216



Fig. 11. ノータイム法で焼成したパンの断面図

・本図は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

## 要約

*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。

MCD4 の菌体収量は市販パン酵母分離株 HP216 と同水準であり、良好な増殖性能を示した。

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、ノータイム法においては 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。

## IV. MCD4 のマルトース発酵力強化機構の調査

### 材料と方法

#### 1. MCD4 の孢子化、孢子囊からの一倍体の分離

MCD4 のマルトース発酵力強化機構の解明を目指し、まずは同一子囊由来の MCD4 一倍体を取得し、マルトース代謝に関わる形質分布、マルトース発酵力強化と 2-DOG 耐性の相関調査を試みた。出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は、培地中に窒素源が存在せず、酢酸塩などの非発酵性の炭素源が存在するとき、細胞周期を停止させて減数分裂を行い、配偶子として孢子の形成が誘導される。孢子は熱・栄養飢餓などの多様なストレスに耐性を示す休眠細胞であり、栄養条件が改善すると孢子から発芽して細胞周期を再開する（大隅・下田，2007）。

MCD4 を YPD 寒天培地に植菌して 30℃で 12 時間培養後、SPO 寒天培地（1.0% 酢酸カリウム、0.1% 酵母エキス、0.05% グルコース、2.0% 寒天）に植菌して室温で 1 週間培養した。光学顕微鏡で孢子形成を確認し、濾過滅菌した微量の Zymolyase（細胞壁溶解酵素）を含む 0.1M リン酸緩衝液（pH6.0）に懸濁し、30℃で 1 時間インキュベートして子囊を分解した。その後、マイクロマニピレーター（顕微解剖器、Axio lab、カールツァイス）を用いて 1 つの子囊から 4 つの孢子を分離し、YPD 寒天培地にて培養した。4 つ全ての孢子が生育した同一子囊由来一倍体を全 30 組 120 株取得し、以降の試験に使用した。

## 2. マルトース資化能調査

マルトース発酵力強化機構を調査するために、まずは取得した MCD4 一倍体におけるマルトース資化能の有無、同一子囊由来一倍体の形質分布を調査した。YPD 寒天培地にて生育させた MCD4 一倍体をそれぞれ滅菌水に懸濁し、マルトース最少寒天培地にスポットした。30℃で 48 時間培養して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。

## 3. マルトース発酵能調査

資化能と同様に、取得した MCD4 一倍体におけるマルトース発酵能の有無、同一子囊由来一倍体の形質分布を調査した。

マルトース発酵能の有無は、2つの指標を観察することで判定した。マルトース発酵能判定用培地中に開口部を下向きにしたダーラム発酵管を入れることにより、マルトースを発酵することにより生じる炭酸ガスの発生を 1 つ目の指標とした。加えて、発酵に伴う pH 低下による BTB (ブロモチモールブルー) の変色を 2 つ目の指標として、以上 2 種の指標を満たす菌株を、マルトース発酵能を有する菌株と判定した。

MCD4 一倍体をマルトース発酵能判定用培地 (2.0% マルトース、0.3% 酵母エキス、0.75% ポリペプトン、BTB 少量、10ml 容試験管・ダーラム管入り) に植菌し、30℃で 3 日間静置培養した。静置培養時のダーラム発酵管中に捕集された炭酸ガスの有無、BTB の色調変化を指標として観察した。

#### 4. 同一子嚢内での 2-DOG 耐性の形質分布調査

同一子嚢由来の MCD4 一倍体において、2-DOG 耐性の有無の形質どのような比率で分布しているかを調査した。MCD4 一倍体をそれぞれ滅菌水に懸濁し、0.08% の 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、30℃で 10 日間静置培養した。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。培養終了後に同一子嚢由来の四分子内での「2-DOG 耐性有り：2-DOG 耐性無し」の比率を調査し、同一子嚢由来 MCD4 一倍体全 30 組における 2-DOG 耐性有無の形質分布を調査した。

#### 5. 2-DOG 耐性とマルトース発酵力の相関調査

MCD4 一倍体の 2-DOG 耐性の有無とマルトース発酵力の相関を調査するために、培養菌体を取得しマルトースを糖源とする M8 液体発酵力を測定した。YPD 培地 10ml (試験管) に YPD 寒天培地に生育させた菌体一白金耳分を接種し、往復型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。その後、培養液全量を糖蜜培地 120ml (5.0% 発酵性糖類、0.3% 硫酸アンモニウム、0.19% CSL、0.19% 尿素、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 500ml 容振盪フラスコ・シリコン栓付) に接種し、往復型振盪培養機にて 100rpm・30℃・40 時間好氣的に培養した。培養後の菌体を遠心分離により回収、蒸留水を用いて 2 回洗浄し、最終的に酵母懸濁液を調製し、液体発酵力測定に使用した。

M8 液体発酵力の測定方法は第 III 章、実験方法 2 にて記載した手法にて実施した。測定した M8 液体発酵力の値を区分分けして各範囲内に該当する菌株数を算出してヒストグラムを作製し、2-DOG 耐性の有無と

マルトース発酵力との相関を調査した。試験は 2 回実施し、平均値を算出して解析を行った。

## 6. 全ゲノム DNA 配列の解析

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。試験菌株を YPD 培地にて 30℃ で 24 時間振盪培養し、15,000g・4℃ で 10 分間遠心分離して菌体を回収し、ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (ZYMO Research) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を次世代 DNA シーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx system、Illumina) の分析に供し、全ゲノム DNA 配列の解析を行った。

## 7. DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析

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して変異箇所の同定を行った。

解析した遺伝子の名称・機能をまとめたリストを **Table 4** に示した。AK46 および MCD4 に存在していた *MAL* 遺伝子座は *MAL1* 遺伝子座 (7 番染色体) と *MAL3* 遺伝子座 (2 番染色体) であったため、マルトース代謝に関わる遺伝子として以上 2 種の *MAL* 遺伝子座に存在する 6 遺伝子を解析した。カタボライト抑制に関わる遺伝子として、転写因子、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、ヘキソーストランス

**Table 4.** 配列を解析した遺伝子の名称・機能

名称	機能
マルトース代謝	
<i>MAL11</i>	マルトースパーミアーゼ
<i>MAL12</i>	$\alpha$ -グルコシダーゼ
<i>MAL13</i>	アクチベーター
<i>MAL31</i>	マルトースパーミアーゼ
<i>MAL32</i>	$\alpha$ -グルコシダーゼ
<i>MAL33</i>	アクチベーター
カタボライト抑制	
<i>MIG1</i>	転写因子
<i>SNF1</i>	プロテインキナーゼ
<i>TUP1</i>	カタボライト抑制調整因子
<i>CYC8</i>	カタボライト抑制調整因子
<i>SNF4</i>	プロテインキナーゼ
<i>GLC7</i>	プロテインホスファターゼ
<i>REG1</i>	プロテインホスファターゼ
<i>GRR1</i>	ユビキチンリガーゼ
<i>HXK2</i>	ヘキソキナーゼ
<i>HXT2</i>	グルコーストランスポーター
<i>HXT4</i>	グルコーストランスポーター

ポーターなどをコードする 11 遺伝子を調査した。

次世代 DNA シーケンサーの情報から DNA 塩基配列の解析を行うソフトウェアプログラムには Tablet を使用した (Milne *et al.*, 2009)。配列のアラインメントを DNA・アミノ酸配列中に生じた置換位置を同定するために Bioedit (Ibis Bioscience) と NCBI (国立生物工学情報センター) の BLAST データベース (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) を使用した。

## 8. リアルタイム RT-PCR での発現量解析

MCD4 のマルトース発酵力が高まっている要因を把握するために、リアルタイム RT-PCR を用いて、マルトース代謝に関わる遺伝子およびカタボライト抑制に関わる遺伝子の RNA 発現量を調査した。

試験菌株には AK46、MCD4、HP216 を使用した。YPD 培地 3ml (試験管) に YPD 寒天培地に生育させた菌体一白金耳分を接種し、往復型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。その後、培養液 0.6ml を YPS 培地 60ml (300ml 容バツフル付三角フラスコ、シリコン栓付) に接種し、旋回型振盪培養機にて 150rpm・30℃・24 時間好氣的に培養した。培養後の菌体を遠心分離により回収、蒸留水を用いて 2 回洗浄し、培養菌体を用いた菌体懸濁液を調製した。

酵母サンプルからのトータル RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、プロトコールに則り実施した。試験菌株 3 菌株から、①培養菌体、②スクロースを糖源とする F10 液体発酵力測定開始から 1 時間目に回収した菌体、③マルトースを糖源とする M8 液体発酵力を測定開始から 1 時間目に回収した菌体からの各 3 種類、計 9 試験区からトー

タル RNA を抽出した。

リアルタイム RT-PCR は、逆転写と PCR を分け 2 ステップにて実施した（北條, 2008）。抽出したサンプルの RNA 濃度（ng /  $\mu$ L）を測定し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits（Applied Biosystems）を用いてプロトコールに則り逆転写を行い、調製した cDNA サンプルの濃度（ng /  $\mu$ L）を測定した。リアルタイム PCR は、Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いて、プロトコールに則り実施した。解析した遺伝子と設計した Primer の情報を **Table 5** に纏めた。反応終了後に Th 値 1.0 としたときの分析サンプルの Ct 値と検量線から相対発現量を算出し、同様に分析した 2 種のハウスキーピング遺伝子（*TDH1*：グルセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼをコード、*TBP1*：TATA 結合タンパク）の相対発現量で補正した平均値を最終的な相対発現量として算出した。

Table 5. PCR に使用した Primer の情報

遺伝子		配列 (5' → 3')
マルトース代謝		
<i>MAL11</i>	Fw	GTCTTGGGTTAGCGGGTACA
	Rv	CAACTCCGCTGATGGAATTT
<i>MAL12</i>	Fw	AAGGTATCACTTCCAAGTTGC
	Rv	AGTCCTCATTGGTACCTATG
<i>MAL13</i>	Fw	GCAACCGTCGAGAAAAGAG
	Rv	ATAGAGCCGCAAGCACTGAT
<i>MAL31</i>	Fw	GTAGCCATGGGGTTGTTTC
	Rv	CAGATCCACTGCAAAGCAAA
<i>MAL32</i>	Fw	ACATACGGTACCAACGAGGA
	Rv	GTTTGCGAGTCGTCAAGTTG
<i>MAL33</i>	Fw	ATGAAGTTGGAGGCTTGGAA
	Rv	ATCATTTAGGCGCAGTGGTC
カタボライト抑制		
<i>MIG1</i>	Fw	GGTTGTGGGCTCTCCAATAA
	Rv	CCATCGTTTTGGGAGAAGAA
<i>SNF1</i>	Fw	TACCACTACGGGCCAAAAAG
	Rv	CCCGGCGTACTCTATAACCA
<i>TUP1</i>	Fw	AAGGACGCGTACGAAGAAGA
	Rv	GCAACTGGAACAGATGCAGA
<i>CYC8</i>	Fw	GCCAAAGTTTTGGAATTGGA
	Rv	CATGCTCGTAGGCTTCCTTC
ハウスキーピング		
<i>TBP1</i>	Fw	GGTGTTTGCCTCTGCATTTT
	Rv	TGGGATCCAAGTTCACCTTC
<i>TDH1</i>	Fw	CTCTACCGGTGCTGCTAAGC
	Rv	AACGGCATCTTCGGTGTAAC

## 結果と考察

### 1. マルトース資化能・発酵能調査

MCD4 一倍体全 120 株のマルトース資化能・発酵能を調査したところ、AK46 および MCD4 (二倍体) と同様に、全菌株が両性能を有していた。

### 2. 同一子囊内での 2-DOG 耐性の形質分布調査

同一子囊由来 MCD4 一倍体全 30 組 120 株を用いて、同一子囊内での 2-DOG 耐性の形質分布を調査した。試験の結果、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」となった (Fig. 12)。MCD4 一倍体全 120 株の中での 2-DOG 耐性の形質分布も、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 株となり、ほぼ同数となった。

### 3. 2-DOG 耐性とマルトース発酵力の相関調査

MCD4 一倍体の培養菌体の 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。測定した M8 液体発酵力の値を区分けして各範囲内に該当する菌株数を算出して作製したヒストグラムを Fig. 13 に示した。M8 液体発酵力の区分分けは、50 未満、100 未満、150 未満、200 未満、200 以上の 5 区分と設定した。

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 倍強にまで高まっていた (2-DOG 耐性有り : 168.1、2-DOG 耐性なし : 9.0)。

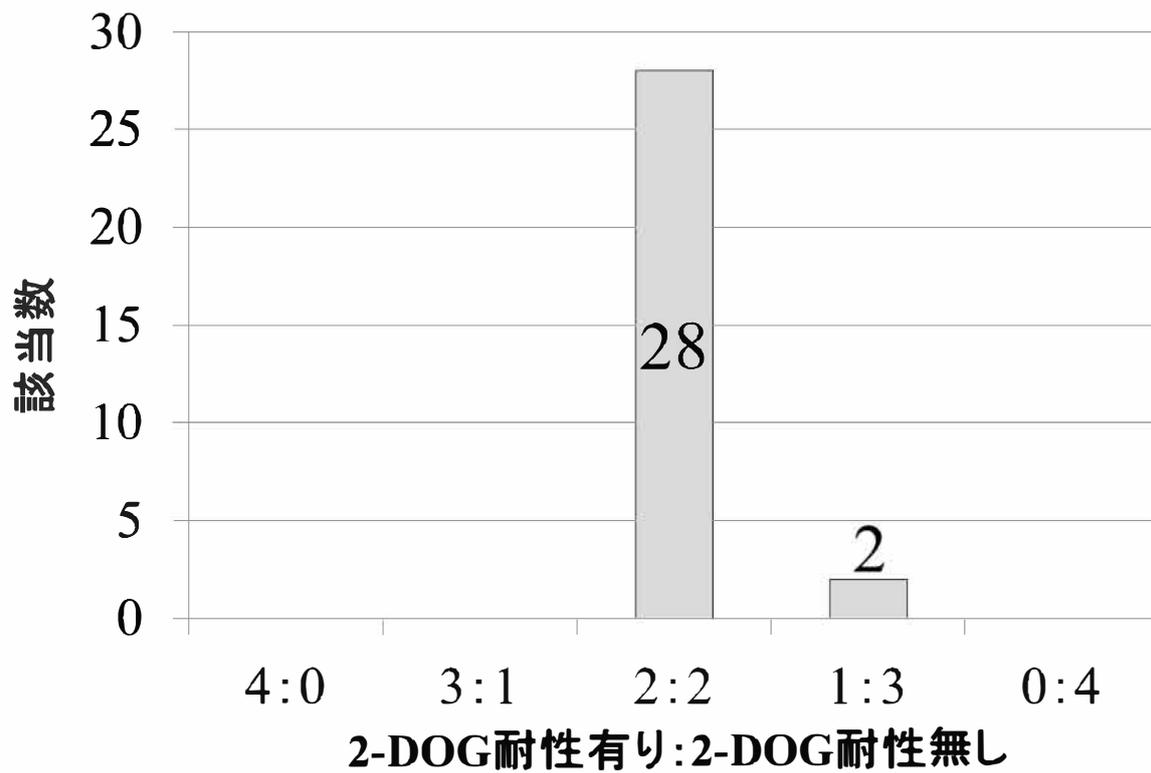


Fig. 12. 同一子囊内での 2-DOG 耐性の形質分布

- ・同一子囊由来 MCD4 一倍体四分子を用い、2-DOG 含有 Ma1 最少培地での生育能を有するとき 2-DOG 耐性有りと判定した。

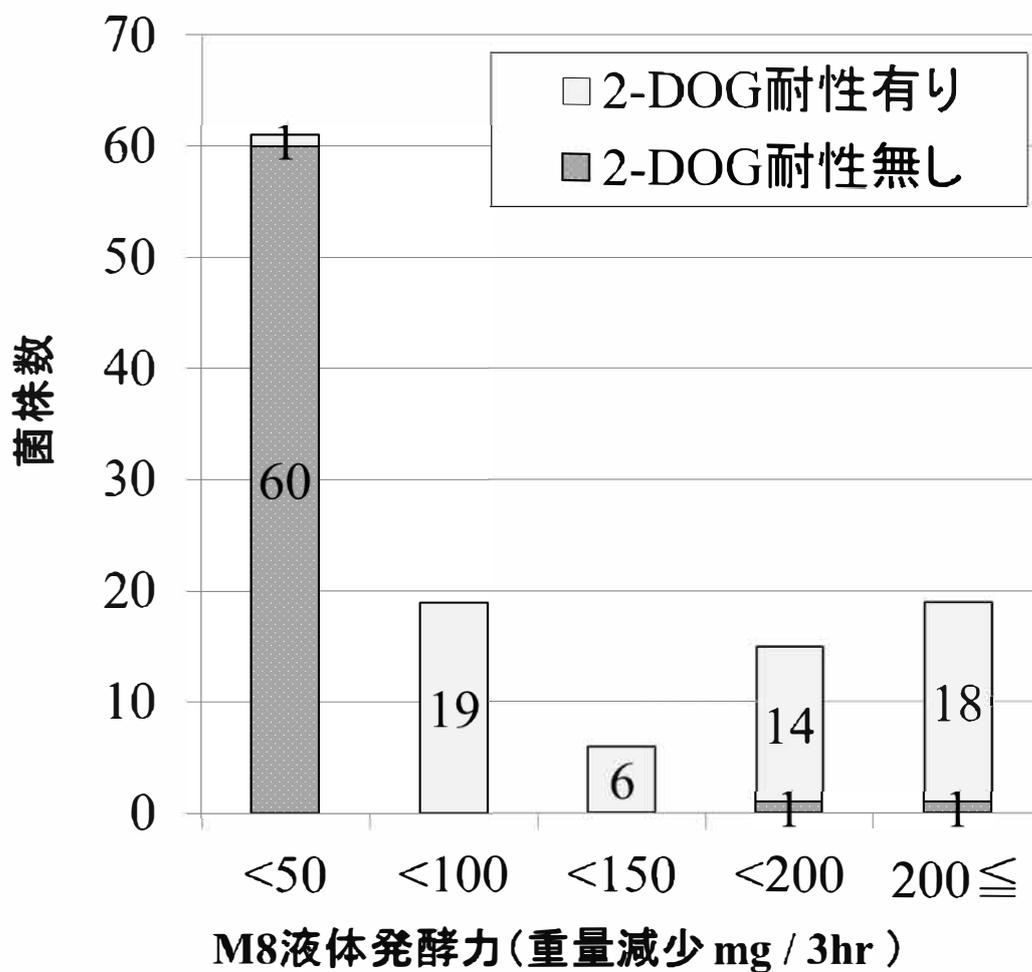


Fig. 13. 2-DOG 耐性と M8 液体発酵力との相関調査

- ・ M8 液体発酵力の値を区分けして横軸とし、各範囲内に該当する菌株数を縦軸にとりヒストグラムを作製した。
- ・ AK46 と MCD4 は、それぞれ「<200」と「200 ≤」の範囲に該当する。

2-DOG 耐性とマルトース発酵力の間には高い相関がみられ、カタボライト抑制に非感受性となることでマルトースの発酵力が高まっていることが要因となっている可能性が示唆された。2-DOG 耐性を有している MCD4 一倍体の M8 液体発酵力の平均値は、MCD4・AK46 の二倍体のそれぞれ平均値よりも低い値を示し、数株は親株 MCD4 と同等の発酵力を有する一倍体も存在したが、一倍体となることで M8 液体発酵力は弱くなる菌株が多くみられた (AK46 : 191.9、MCD4 : 320.4)。AK46 の一倍体を用いて過去に実施した同様の試験においても、やはり全菌株がマルトース資化能・発酵能は有しているものの、M8 液体発酵力の平均値は微弱な値を示すことがわかっており (AK46 一倍体 35 株の平均値 : 20.7)、MCD4 と AK46 の一倍体は、マルトース資化能・発酵能を有していても、その発酵力は低くなる傾向がみられた。

#### 4. DNA 塩基配列・アミノ酸配列の比較解析

マルトース発酵力強化機構の解明を目指し、AK46 と MCD4 の全ゲノム配列を次世代 DNA シーケンサーにより解析し、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、アミノ酸配列を比較した。

配列を比較し、各遺伝子のアミノ酸配列中に生じていた置換を **Table 6** に纏めた。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 *MAL11*、*MAL31*、そしてアクチベーターをコードする *MAL13*、*MAL33* の塩基配列中に、DNA の片一方は AK46 と同配列でありもう一方にのみ変異が存在している混合塩基

**Table 6.** MCD4 のマルトース代謝およびカタボライト抑制に関与する遺伝子に生じたアミノ酸置換・欠失の位置

タンパク質	総アミノ酸数	アミノ酸 置換・欠失
マルトース代謝		
Mal11	616	A,T80T / I,V333I / A,V548A / S,T556T / H591L / D592I / S593R / I594X <sup>※</sup>
Mal12	584	none
Mal13	473	N,T243T / T299I,T / D314D,E / T318A,T / S320S,X / N327N,Y / I330I,V / S333A,S / R337H,R / I341I,V / N361N,S / G362A,G / Q363H,Q / I364I,V / E381D,E,K,N / D385D,E,G / V391I,V / V393A,I,M,T,V / T395A,T / L396I,L / I398I,V / T400N,T
Mal31	614	H49H,R / A122A,S / S146P,S / I,M167I,L,M / M175L,M / A,T247A / A265A,P / E268E,D / E339E,K / T349S,T / V354L,V / G357G,S / I358I,V / C374C,S,T / S375S,T / A378A,T / S379P,Q,S,X / S394G,S / I,V415I,M / V508A,I,T,V / T509R,S,T / F534F,L / L536F,L / A540A,V / V544I,V / Q,X591Q / Q,X593Q
Mal32	584	none
Mal33	468	S240A,S / V243I,V / H244H,K,N,Q / Q257L,Q / F260F,V / D269D,E / F272F,L / M274M,V / F286F,Y / E292E,V / G296D,G / K305K,R / K308K,N / A313A,T / L315H,L / E316D,E / A,V325A,I,M,T,V / I327F,I / F329C,F / S330F,L,S / H332H,P / I334I,V / A336A,T / M,V342I,M,V / F343F,L / Q344H,Q / N346L,N / K365K,R / D369D,E,G / I371I,M,T / S390A,S / V393I,V / K403K,Q / Y404H,K / H406H,K,N,Q
カタボライト抑制		
Mig1	504	none
Snf1	633	none
Tup1	713	none
Cyc8	967	Q26R,Q / Q28R,Q
Snf4	323	none
Glc7	488	X177L,X / E180E,G / C189C,W / R197G,R / A200A,G /
Reg1	1015	none
Grr1	1152	N44N,- / N45N,- / N46N,-
Hxk2	487	none
Hxt2	577	none
Hxt4	542	none

• Dunnen and Antonarakis (Dunnen and Antonarakis, 2000) の記載に習い、(元のアミノ酸) (アミノ酸の変異位置) (置換・欠失したアミノ酸) で表記した。

※MAL11のヌクレオチド1772位に欠失を生じ、アミノ酸591位以降にフレームシフト変異が発生していた。

• 本表は Mikumo *et al.*, 2015 より転載した。

での DNA 配列置換がみられ、複数のアミノ酸置換がみられた。*MAL11* に生じた置換は、111 番目から 567 番目のアミノ酸までの糖類のトランスポーターと相同性が高い Sugar porter family 配列中には生じていないが、混合塩基での置換ではあるものの DNA 塩基配列 1772 位の欠失変異に伴うフレームシフトが起こり、アミノ酸 3 残基後にストップコドンを生じて全長は 23 残基短くなっていた。*MAL13* は 4 番目から 36 番目のアミノ酸までの高い相同性がみられる DNA 結合ドメイン配列である GAL4-like Zn(2)Cys(6) binuclear cluster DNA-binding domain 中に置換はみられなかったものの、84 番目から 351 番目のアミノ酸までの転写調整因子間で相同性が高い TF\_MHR (Fungal Transcription Factor regulatory Middle Homology Region) 配列中に混合塩基でのアミノ酸置換が複数みられ、加えてアミノ酸 320 位に混合塩基ながらもストップコドンを生じており、後半の TF-MHR 配列 31 残基を含む 154 残基分短くなっていた。*MAL31* においては 74 番目のアミノ酸から 557 番目のアミノ酸までの Sugar porter family 配列中に混合塩基でのアミノ酸置換が複数みられ、更にアミノ酸 379 位に混合塩基の翻訳停止を生じて TF-MHR 配列後半部の 178 残基を含む 236 残基分短くなっていた。また、Sugar porter family 配列からは外れるが、元株 AK46 もアミノ酸 591 位・593 位に混合塩基での翻訳停止を生じていたが、MCD4 はいずれも単一塩基となり翻訳停止を生じていなかった。*MAL33* は *MAL13* と同様に 4 番目から 36 番目のアミノ酸までの GAL4-like Zn(2)Cys(6) binuclear cluster DNA-binding domain 配列中に置換はみられなかったものの、79 番目から 346 番目のアミノ酸までの転写調整因子において相同性が高い配列である TF-MHR 配列中には複数の混

合塩基でのアミノ酸置換がみられた。

MCD4 の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は AK46 の約 1.6 倍に高くなっていたにも関わらず、 $\alpha$ -グルコシダーゼをコードする *MAL\_2* 遺伝子の塩基配列中に変異を生じていなかったことから、 $\alpha$ -グルコシダーゼの発現が高まることで活性が高まった可能性が示唆された。その要因として、*MAL\_1*・*MAL\_2* の活性化因子である *MAL\_3* に生じた変異に起因している可能性が考えられる。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が示唆された。また、マルトース代謝能が高まっている要因の 1 つに、マルトースパーミターゼをコードする *MAL\_1* に生じた変異によりパーミターゼの活性に変化を生じている可能性も示唆された。

塩基配列を比較したカタボライト抑制に関わる 11 遺伝子の配列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。*CYC8* に生じた変異は、46 番目から 111 番目、94 番目から 391 番目、150 番目から 183 番目、328 番目から 395 番目のアミノ酸までの 4 箇所の TPR 配列 (Tetratricopeptide Repeats) 中には生じていなかった。同様に、*GLC7* においても 6 番目から 300 番目までのアミノ酸までのプロテインホスファターゼの活性ドメインを外れた位置に変異を生じていた。*GRR1* には 38 番目から 49 番目までの連続したアスパラギン配列のうち 3 残基の欠失がみられたが、他には変異を生じていなかった。

AK46 を元株とした 2-DOG 耐性変異株である MCD4 は、グルコース存在下でのマルトースの消費量調査からカタボライト抑制に非感受性となっていることが示唆されており、MCD4 一倍体を用いた試験においても、MCD4 のカタボライト抑制には強い相関がみられていることから、MCD4 のカタボライト抑制に関わる遺伝子に変異を生じていることでカタボライト抑制に非感受性となり、マルトース発酵力が高まっていると予想していた。しかし、MCD4 のカタボライト抑制に関与する 11 遺伝子には明確な変異を生じておらず、本検討でのカタボライト抑制に関与する遺伝子配列の比較解析によって、MCD4 がカタボライト抑制に非感受性となっている要因の解明、マルトース発酵力強化との関連を裏付けることはできなかった。

## 5. リアルタイム PCR での発現量解析

マルトース代謝に関わる 6 種の *MAL* 遺伝子と、カタボライト抑制に関与する 4 遺伝子のリアルタイム PCR での発現量解析を実施した結果をそれぞれ **Fig. 14-A**、**Fig. 14-B** にまとめた。

マルトースを糖源とする M8 液体発酵力測定用培地に接種して 1 時間培養させた菌体において、MCD4 は AK46 よりも、*MAL12* では 3.0 倍、*MAL11* と *MAL31* では 1.8 倍に発現が高まっている傾向がみられ、マルトース発酵力の高まりとこれらの発現量の高まりとの関連が示唆された。また、配列比較解析により混合塩基での変異ではあるものの一対の DNA の片一方に翻訳停止を生じていた *MAL13* の発現量は AK46 と大きな差異は見られなかったが、変異に伴う構造変化により、発現量が高まっていた *MAL12* や *MAL31* の発現を促進している可能性が示唆された。*MAL31*

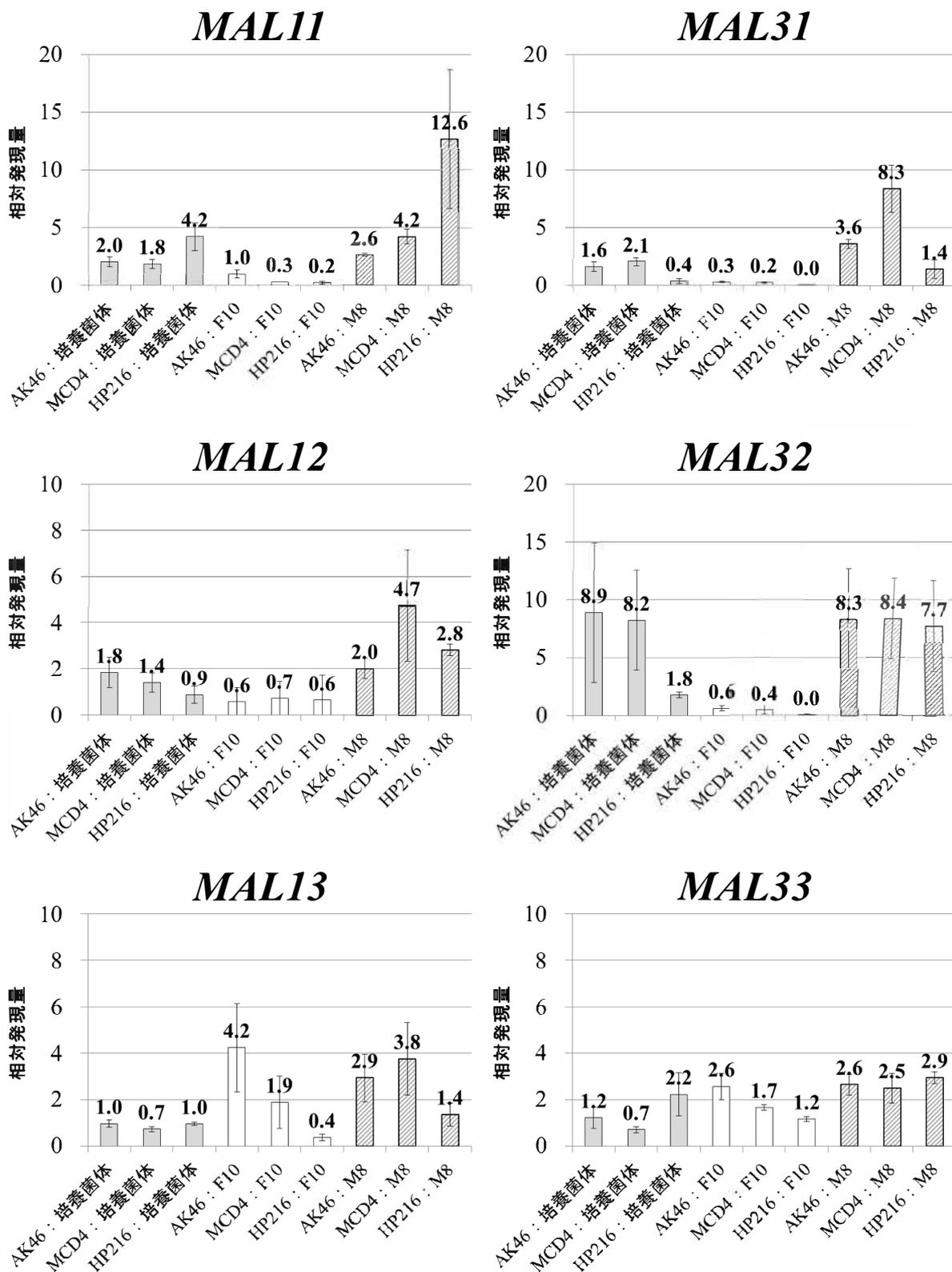


Fig.14-A. リアルタイム PCR による発現量解析  
(マルトース代謝に関わる遺伝子)

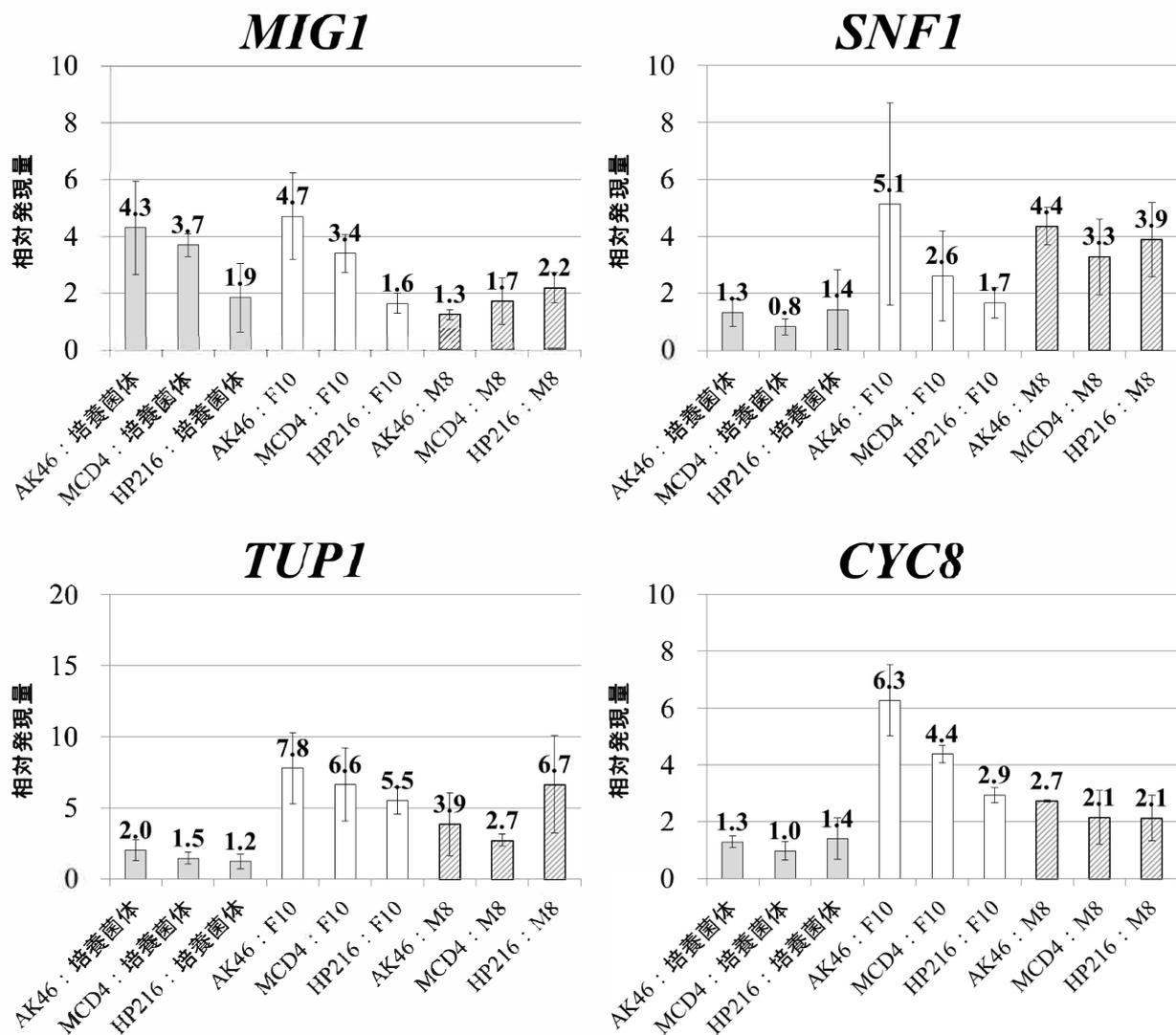


Fig. 14-B. リアルタイム PCR による発現量解析  
(カタボライト抑制に関与する遺伝子)

はやはり混合塩基での変異ではあるがアミノ酸置換と翻訳停止を生じており、その活性に変化を生じている可能性が示唆されている。活性の変化に加えて、リアルタイム PCR の結果からマルトースパーミアーゼの発現量が高まることでマルトース発酵力向上に影響を与えている可能性も示唆された。

同様に、M8 液体発酵力測定用培地に接種した菌体におけるカタボライト抑制に関与する 4 遺伝子の発現量を調査したところ、いずれの遺伝子においても MCD4 と AK46 はほぼ同程度の発現量を示し、MCD4 に特徴的な発現量の高まりを示した遺伝子はみられなかった。配列解析の結果からは、MCD4 にはカタボライト抑制に非感受性となることを裏付ける明確な変異はみられず、リアルタイム PCR の結果から発現量にも差異が見られないことから、MCD4 がカタボライト抑制に非感受性となる要因の解明には至らなかった。

## 要約

2-DOG 耐性変異株 MCD4 のマルトース発酵力強化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調査を行い、加えて、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配列比較解析、リアルタイム PCR による発現量を調査した。

同一子囊由来 MCD4 一倍体四分子における 2-DOG 耐性の形質は、「2-DOG 耐性有り：無し=2：2」となる組み合わせが最も多く、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、2-DOG 耐性とマルトース発酵力の間には高い相関がみられた。

配列比較解析を行った結果、MCD4 の *MAL\_1*、*MAL\_3* には混合塩基でのアミノ酸置換・翻訳停止を生じており、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が示唆された。また、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。加えて、菌体回収時からマルトースを糖源とする培地に接種した際の *MAL* 遺伝子発現量の高まりをリアルタイム PCR で調査すると、MCD4 は *MAL12* では AK46 の 3.0 倍、*MAL11* と *MAL31* ではそれぞれ 1.8 倍に高まっており、これらの遺伝子の発現量の高まりとマルトース発酵力向上の関連が示唆された。一方、カタボライト抑制に関わる遺伝子には明確な変異はみられず、リアルタイム PCR においても、いずれの遺伝子の発現量に AK46

と MCD4 に差異はなく、MCD4 に特徴的な発現量を示した遺伝子はみられず、MCD4 が 2-DOG 耐性を示しカタボライト抑制に非感受性となっている要因を特定することはできなかった。

## V. 総合考察

北海道のエゾヤマザクラから分離された野生酵母である *Saccharomyces cerevisiae* AK46 の改良点であるマルトース発酵力を向上させることにより製パン性能の改善を目的として、2-DOG 耐性を付与した自然変異株を取得し、MCD4 を選抜した。YPS 培地での本培養を行った培養菌体を用いて製パンに関わる性能を調査すると、MCD4 は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。データを記載していないが、MCD4 の実用化を想定し、イースト製造の実製造工程を模して糖蜜を糖源として流化培養を行い、培養菌体の性能を調査したところ、MCD4 は AK46 とほぼ同等の菌体収量を示し、M8 液体発酵力は AK46 の約 2 倍 (MCD4 :  $402.1 \pm 47.6$ 、AK46 :  $206.1 \pm 65.3$ )、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は約 1.6 倍に高まり (MCD4 :  $249.0 \pm 24.9$ 、AK46 :  $151.3 \pm 42.0$ )、流加培養菌体も YPS 培養菌体と同様にマルトース発酵力の高まりが確認され、YPS 培地での培養菌体よりも流加培養菌体のほうが製パンに関する性能が高まっていた。MCD4 のような 2-DOG 耐性を付与した菌株の実用化に向けた課題としては、培養菌体の 2-DOG 耐性の保持率の維持が挙げられる。培養菌体の 2-DOG 耐性の保持率の安定はイースト製品の発酵面での品質

の安定と深く関連することが予想されるために非常に重要であるが、これまでの研究で得られた知見から、イーストの実製造工程は最終培養まで培養工程が多く培地中に 2-DOG を含有していないために、培養工程が進むほどに復帰変異を生じて 2-DOG 耐性の保持率が低下していくことがわかっている（例：最終培養に用いる種菌菌体：93%、最終培養菌体：81%）。MCD4 取得時にも 2-DOG 含有マルトース最少培地にて複数回培養を行い変異の固定を試みているが、更に変異の固定を重ねることにより 2-DOG 耐性の保持率を高め、実用化に向けた課題を解決できる可能性がある。

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、マルトースパーミターゼをコードする *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ったと報告されている (Hong and Marmur., 1987)。

*MAL12* および *MAL32* の上流にも同様の T リッチ配列が存在しており、AK46 と MCD4 の *MAL12* 及び *MAL32* の上流配列を確認したところ、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。また、マルトース発酵力向上と  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりには直接的な相関が見られることから、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性向上に着目してその要因を探ることでマルトース発酵力の向上の要因の解明に取り組んだ。 $\alpha$ -グルコシダーゼの活性測定に使用する粗酵素液中のタンパク質含量を Bradford 法にて測定し、 $\alpha$ -グルコシダーゼの比活性を測定したところ、AK46 と MCD4 の粗酵素液中のタンパク質含量はほぼ同一であり (AK46 :  $0.354 \pm 0.013$  mg/ml、MCD4 :  $0.362 \pm 0.009$  mg/ml)、酵素活性値と同様に MCD4 の  $\alpha$ -グルコシダーゼの比活性値は AK46 よりも高まっていた。MCD4 の *MAL12*・*MAL32* の DNA 塩基配列は AK46 と同一で変異を生じていなかったことから、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりは変異による活性の高まりではなく、 $\alpha$ -グルコシダーゼの発現量が高まり粗酵素液中のタンパク質における  $\alpha$ -グルコシダーゼの比率が高まることで酵素活性が高まっている可能性が考えられたが、培養菌体から抽出した全 RNA を用いたリアルタイム PCR での発現解析の結果では AK46 と MCD4 の *MAL12* と *MAL32* の発現量に差異は見られず、MCD4 の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性の高まりの要因も特定することはできず、マルトース発酵力向上の要因を特定できなかった。

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証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できるようになっていることから、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ている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 液体発酵力が高まる傾向がみられ、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が、1 つの可能性として、MCD4 のマルトース発酵力の高まりは、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ことで、2-DOG 耐性の付与によりマルトース発酵力が顕著に高まっているように見えてしまっている可能性が考えられる。

本研究にて MCD4 のマルトース発酵力向上の要因を特定し、加えて MCD4 が 2-DOG 耐性を付与されることによりカタボライト抑制に非感受性となっていることを確証づけることはできなかった。今後の検討に際し、自然変異により変異株を取得したことに起因してか MCD4 のマル

トース代謝に関わる遺伝子・カタボライト抑制に関与する遺伝子に生じていた変異はいずれも混合塩基での変異であったため、2-DOG 耐性を示す MCD4 一倍体の配列解析を行うことで差異が明確となり、要因把握が容易になると考えられる。またリアルタイム PCR において、全 RNA を抽出したサンプルの条件に、グルコースとマルトースが共存した試験区を加えることで、MCD4 と AK46 で相対発現量に差異を生じる遺伝子を確認でき、2-DOG 耐性、カタボライト抑制非感受性の要因解明に繋がると考えられる。

## VI. 参考文献

Bell, P. J. L., Higgins, V. J., and Attefield, P. V. (2001).

Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. *Lett. Appl. Microbiol.*, **32**, 224-229.

ブルーランジェリー フランセーズ ドンク : 「フランスパン・世界のパン本格製パン技術 第8版」, 旭屋出版, 2010.

Charron, M. J., Dubin, R. A., and Michels, C. A. (1986). Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3891-3899.

Charron, M. J., Read, E., Haut, S. R., and Michels, C. A. (1989). Molecular evolution of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces*. *Genetics*, **122**, 307-316.

Entian, K.-D., and K.-U. Fröhlich. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase P II as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.*, **158**, 28-35.

Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **Vol. 62**, 334-361.

Higgins, V. J., Braidwood, M., Bell, P., Bissinger, P., Dawes, I. W., and Attfield, P. V. (1999). Genetic evidence that high noninduced maltase and maltose permease activities, governed

- by *MALx3*-encoded transcriptional regulators, determine efficiency of gas production by baker's yeast in unsugared dough. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 680-685.
- Hong, S.H., and J. Marmur. (1987). Upstream regulatory regions controlling the expression of the yeast maltase gene. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 7, No. 7., 2777-2483.
- Hu, Z., Nehlin, J. O., Ronne, H., and Michels, C. A. (1995). MIG1-dependent and MIG1-independent glucose regulation of *MAL* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **28**, 258-266.
- 井上好文：「パン入門」，日本食糧新聞社，2010.
- 北條浩彦：「原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド」，羊土社，2008.
- Mikumo, D., Takaya, M., Orikasa, Y., and Ohwada, T. (2015). Improved leavening ability in dough of a wild yeast, *Saccharomyces cerevisiae* AK46 2-deoxyglucose resistant mutant. *Food Sci. Technol. Res.*, **21**(4), 623-630.
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F., and Marshall, D. (2009). Tablet-next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*, **26**, 401-402.
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., and Michels, C. A. (1994). Genetic variation of the repeated *MAL* loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, **136**, 803-812.

- Novak, S., D' Amore, T., Russell, I., and Stewart, G. G. (1990). Characterization of sugar transport in 2-deoxy-D-glucose resistant mutants of yeast. *J. Ind. Microbiol.*, **6**, 149-156.
- Novak, S., Zechner-Krpan, V., and Maric, V. (2004). Regulation of maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotechnol.* , **42**, 213-218.
- Oda, Y., and Ouchi, K. (1989a). Maltase gene and  $\alpha$ -glucosidase activities: their effects on dough-leavening. *Yeast*, **5**, 135-139.
- Oda, Y., and Ouchi, K. (1989b). Principal-component analysis of the characteristics desirable in baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* , **55**, 1495-1499.
- Oda, Y., and Nakamura, K. (2009). Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res.* , **9**, 742-748.
- Oda, Y., Mikumo, D., Tajima, K., and Yamauchi, H. (2010a). Characterization of an alternative baking strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented cherry fruits by the analysis of *SUC2* gene. *Food Sci. Technol. Res.* , **16**, 45-50.
- Oda. Y., Mikumo, D., Leo, F., and Urashima, T. (2010b). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains by the *SUC2* gene sequences. *J. Gen. Appl.*

*Microbiol.*, **56**, 355-358.

小田有二、山内宏昭、田村雅彦：『産学官連携による製パン用「とち野酵母」の開発』, 日本食品科学工学会誌 Vol. 59, No. 1, 1-5 (2012) [総説] .

大隅良典、下田親：「酵母のすべて」, シュプリンガー・ジャパン, 2007.

Randez-Gil, F., and Sanz, P. (1994). Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 581-586.

Rincón, A. M., Codón, A. C., Castrejón, F., and Benítez, T. (2001). Improved properties of baker's yeast mutants resistant to 2-deoxy-D-Glucose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4279-4285.

佐藤友太郎：「パン酵母」, 光琳全書, 1966.

Sherman, F., and Hicks, J. (1991). Micromanipulation and dissection of asci. *Methods Enzymol.*, **194**, 21-37.

Sujaya, I. N., Mikumo, D., Orikasa, Y., Urashima, T., and Oda, Y. (2011). Baking properties of *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from *Brem*, a traditional rice wine from Bali. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 369-373.

Suzuki, Y., and Tamura, M. (1984). Relation between vitamin requirement and properties in baker's yeast strains. *Technical Rep. Japan Yeast Ind. Assoc.*, **54**, 7-13.

竹谷光司：「新しい製パン基礎知識再改定版」, パンニュース社, 2009.

Tanaka, Y., and Sato, T. (1969). Fermentation of fructosides in

wheat flour by baker' s yeast. *J. Ferment. Technol.*, **47**,  
587-595.

田中康夫、松本博：「製パンの科学＜Ⅰ＞製パンプロセスの科学 第3  
版」，光琳，2008.

田中康夫、松本博：「製パンの科学＜Ⅱ＞製パン材料の科学」，光琳，  
1992.

Treitel, M. A., and Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1  
is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA*, **92**, 3132-3136.

柳島直彦、大島泰治、大隅正子：「酵母の解剖」，講談社サイエンティ  
フィック，1981.

## VII. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心にご指導頂きました帯広畜産大学食品科学研究部門機能科学分野教授・大和田琢二先生および帯広畜産大学食品科学研究部門機能科学分野助教・折笠善丈先生に厚く御礼申し上げます。また、学部・修士課程と実験・研究の基礎をご教授下さいました帯広畜産大学理事・副学長・小田有二先生に改めて感謝申し上げます。

副査を引き受けて下さいました山形大学農学部食品・応用生命科学コース・発酵制御学分野教授・小関卓也先生、最終審査でご意見賜りました岩手大学農学部応用微生物学研究室教授・下飯仁先生に謹んで感謝の意を表す次第であります。

また、研究の遂行にあたりご協力いただいた帯広畜産大学食品科学ユニット・生物有機化学研究室の高谷政宏様をはじめとする卒業生、学部学生諸氏に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行する機会を与えて下さり、会社業務と博士課程の両立に多大なるご支援・ご指導・ご鞭撻を賜りました日本甜菜製糖株式会社、佐渡谷裕朗取締役飼料事業部長・総合研究所担当、内野浩克総合研究所長、石栗秀技術部長、田村雅彦美幌製糖所副所長、今井奈津夫食品事業部次長、そして森谷浩上席研究員をはじめとする総合研究所第2グループ微生物の皆様にご心より感謝申し上げます。