

分子生物学的手法を用いた新規酵母の開発

富永達矢* 鶴園大* 奥沢洋平*

Development of a Novel Yeast using Molecular Biological Methods

TOMINAGA Tatsuya*, TSURUZONO Masaru*, OKUZAWA Yohei*

抄録

漬物由来の酵母、*Saccharomyces servazzii* の育種・改良を試みたところ、新規性質を有する株が取得された。併せて、2-デオキシグルコース(2-DG)耐性株を取得したところ、発酵力が強化されている株があった。これらの株を用いて、製パン試験を行った結果、野生株のものより、比容積の増加したパンが試作できた。

キーワード：*Saccharomyces servazzii*，モニタリング，2-DG，製パン

1. はじめに

清酒・パンをはじめとして、ワイン・焼酎・味噌・醤油など、酵母を利用した産業は非常に多岐にわたっている。しかし近年、これらの食品産業は成熟してきており、その一因として、多様化する消費者ニーズに応えきれないという現状が挙げられる。現在までに知られている酵母の数は、40属・500種類ともいわれているが、そのうち産業に利用されているのは、清酒やパン用の *Saccharomyces cerevisiae* や味噌や醤油用の *Zygosaccharomyces rouxii* など、ごく一部に過ぎない。そこで、本研究においては、当研究所で窒素充填化漬物の開発中に見出された酵母^{1),2)}、*Saccharomyces servazzii* を用いることにより、新規食品の開発を目標とした。

本年度も前年度に引き続き、高香気性酵母の育種を行った³⁾。また、その塩基配列情報をもとに、酵母のモニタリング技術の開発を試みた。さらに、発酵力の強化を目的とした、育種・選抜を行い、野生株ならびに育種株により製パン試験を試みた

ので報告する。

2. 研究方法

2.1 菌株、培地、培養条件

S. servazzii JCM5201, *S. servazzii* JCM5179 (基準株), *S. cerevisiae* IAM14383 (基準株), 協会7号酵母, 協会9号酵母を実験に供した。培地としては、YPD 培地・GYNB 培地・YPG 培地(YPD 培地を基に、グルコースの代わりにガラクトースを用いたもの)を用い、25℃で培養した。生育速度の算出にはバイオフォトレコーダー TN-2612 (ADVANTEC 東洋)を用いた。

2.2 突然変異株の選抜

昨年度同様、EMS により突然変異を誘発し、トリフルオロロイシン(TFL)培地により選抜した³⁾。2-DG 耐性株の取得は以下のように行った。YPD 培地にて25℃で1日前培養させた菌体を集菌し、蒸留水で2度洗浄したあと、あらためて菌体混濁液を作った。2-DG 選択培地(ガラクトース 0.1%, Yeast Nitrogen Base 0.67%, 2-DG 0.01~0.10%, Agar 2%)上に、混濁液を菌数が 10^6 個程度になるように塗布した。一週間25℃で培養を行い、生育してきた株を2-DG 耐性株とした。

* 北部研究所 生物工学部

2.3 酵素活性の測定

Ulm らの方法に従って、 α -IPM シンターゼの活性測定を行った⁴⁾。タンパク質の濃度はブラッドフォード法により測定し、 α -IPM シンターゼ活性は、1 分間・1 mg のタンパク量あたりに放出された coenzyme A の量(nmol)として表した。

2.4 PCR、電気泳動

酵母ゲノム DNA に対し、F・Rプライマーまたは SsF (5'-TAATGACAAGGTTATACCAATTCGTGGGAGT)、SsR (5'-CTATAGGATTTTCATCATTATGAGAGGATCTG) プライマーを用い PCR 反応を行った。PCR 反応は、変性反応を 94 で 30 秒、アニーリング反応を 50 で 30 秒、伸長反応を 72 で 30 秒行い、35 サイクル繰り返した。PCR 産物は、2 %アガロースゲルを用いた電気泳動ならびに泳動後の臭化エチジウム染色により、紫外光にて確認した。

2.5 エタノール量の測定、香り成分分析

YPD 培地にて 25 で 1 日予備発酵させた後、振盪して菌体を混濁させた。その混濁液 30 μ l を 3 ml の 10 % YPD 培地に、また、混濁液 100 μ l を 3 ml の 10 % YPG 培地にそれぞれ加えて、25 で 1 日静置発酵させて生じたエタノールの濃度をアルコメイトにより測定した。香り成分は、国税庁所定分析法注解⁵⁾を参照し、ヘッドスペース法により分析した。

2.6 ガス発生試験

酵母菌体 0.5 g を 20 ml のグルコース 10 %水溶液に溶解して栓をし、30 の恒温槽中にて 100 rpm で振盪して発酵させた。このとき発生した炭酸ガスの量を、連結しているガス置換瓶から押し出された液量により求めた⁶⁾。

2.7 製パン試験

強力粉 300 g に対して、グルコース 5 %、塩 1.5 %、脱脂粉乳 2 %、ショートニング 5 %、吸水率を 76 ~ 78 %程度に調整した。酵母の量は、通常時は 2 %とし、倍量使用時のみ 4 %とした。混捏後、室温 24、湿度 70 %の発酵室で 90 分一次発酵させ、パンチを行った後、さらに 30 分二次発酵させた。その後、分割、ガス抜き、成形をして一斤用の型に詰め、一次発酵、二次発酵と

同じ条件で、生地が型の上部に到達するまで三次発酵を行った。最後にオープンで焼成を行い、試験パンを得た。パンは、荒熱がとれた後に重量と容積の測定を行い、容積を重量で割ることにより求まる比容積をパンのふくらみの指標とした。1 日経過後にパンを切り、内相の観察、および官能審査を行った。また、並行して、こね上げたパン生地 110 g をピーカーに詰め、一次発酵および二次発酵での生地膨脹量の測定を行った。

3. 結果及び考察

3.1 TFL 耐性株の性質

昨年度の研究により、*S.servazzii* の TFL 耐性株 (T-1)でも *S.cerevisiae* 同様、イソamilアルコール(IAA)生産量が親株よりも増加していた³⁾。しかし、*S.cerevisiae* では最大で親株の 3 倍量の IAA を生産する株が取得されているのに対し⁷⁾、T-1 で、その量は親株と比して約 2 倍量にすぎなかった。そこで、本年も引き続き、TFL 耐性株の取得を行い、さらに IAA 生産量の増加した株の取得を目指した。

突然変異の誘発により、新たに 2 株の TFL 耐性株を取得した(T-2, T-3)。これら 2 株の IAA 生産量は親株の 66% (T-2), 54% (T-3)に過ぎなかった(表 1, 麹培地)。このような株の例は、ほかの酵母では知られていないので、さらにその性質の解明を進めた。

IAA の生合成経路は、グルコース由来の経路と、ロイシン(Leu)由来の経路と 2 通り存在することが知られている。そのうちのどちらの経路が、各々の変異体で変化しているのか調べるために、Leu を全く含まない培地(GYNB)と Leu を加えた培地とで IAA の生産量を調べた(表 1)。GYNB 培地では、全ての IAA がグルコースから生産される。GYNB 培地では、親株、T-2、T-3 とともに IAA 生産量はほとんど相違なかった。しかし、Leu を加えた培地では、親株の IAA 生産量が 120 mg l^{-1} 増加したのに対し、T-2 では 50 mg l^{-1} 、T-3 では 10 mg l^{-1} の増加にすぎなかった。この結果は、T-2、T-3 においては、Leu を IAA に変換する機能が低

表1 IAAの生産量 (単位: mg l⁻¹)

麹培地	GYNB	GYNB+ 5mM Leu
野生株	184±10	33±1.7
T-1	375± 1.9	46±1.3
T-2	121± 5.2	36±1.7
T-3	100± 4.6	34±1.6

表2 a-IPMシンターゼの活性

添加なし	10mM Leu 添加	残存活性 (%)
野生株	14.2±1.38	1.1±0.23
T-1	23.4±0.73	11.9±0.55
T-2	16.8±2.98	2.2±0.25
T-3	18.4±2.41	1.6±0.00

下していることを示唆している。

さらにその可能性を調べるために、α-IPMシンターゼの活性測定を行った(表2)。親株のα-IPMシンターゼは、Leuによりフィードバック阻害を受けるため、Leuを加えた条件では、10%以下の活性しか示さなかった。T-1はその阻害が部分的に解除され、その結果IAAの生産量が上昇した株と考えられたが、α-IPMシンターゼ活性をLeu存在下においても50%以上有していた。それに対して、T-2, T-3では、親株同様、α-IPMシンターゼ活性が各々13%, 9%にまでLeuにより阻害されており、T-1とは異なる型の変異体であるという可能性を支持している。

これまでにTFL耐性株の取得は*S.cerevisiae*や*Z.rouxii*でなされてきた^{7),8)}。その報告例の表現形質は、T-1と同様のものであり、今回取得されたT-2, T-3のような形質株の報告例は知られていない。T-2, T-3のような新規酵母株が分離できたのは、*S.servazzii*特有の性質による影響であるかもしれない。今回の実験結果より、他の可能性が残るものの、T-2, T-3ではLeuの菌体内への取り込み能が十分に行われなくなった可能性が考えられる。Leuの取り込み能を損ねているのならば、その形質を活かした新規な食品の開発へと活かせるであろう。

3.2 *S.servazzii* 特異的 PCR 法の開発

食品中へ酵母を添加した際、目的の酵母の発酵

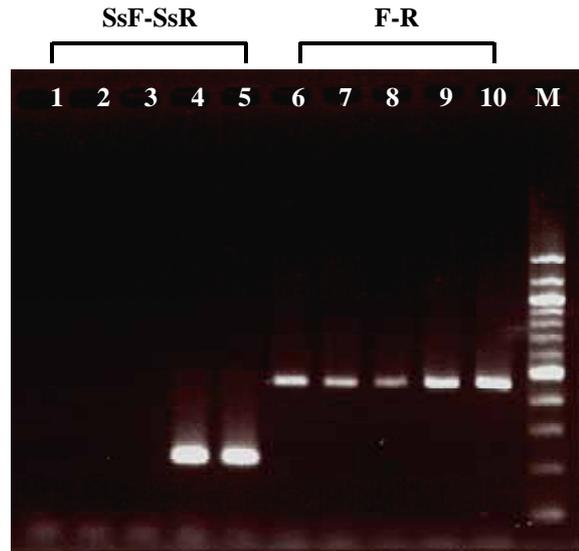


図1 PCR産物の電気泳動像

M: 100 bp ラダー DNA マーカー。

- 1, 6: *S.cerevisiae* 基準株。2, 7: 協会9号。
- 3, 8: 協会7号。4, 9: *S.servazzii* 基準株。
- 5, 10: *S.servazzii* JCM5201。

中の消長をモニタリングする必要がある。モニタリングする手法としては、従来、培養法が主に行われてきたが、大変な労力・時間を必要とする作業であった。しかし近年、DNAを利用し、迅速かつ簡便なモニタリングの方法が様々に開発されている。そこで本研究では、*S.servazzii*を特異的に検出するためのPCRプライマーを設計し、*S.servazzii*由来のゲノムのみを増幅する、種特異的PCR法による*S.servazzii*モニタリング手法の確立を試みた。

増幅領域として、昨年度に塩基配列を解析した、TFL作用部位といわれている*LEU4*相同遺伝子中の配列を検討した。しかし、塩基配列解析に用いたプライマーF, RによりPCR反応を行ったところ、*S.servazzii*のみならず、試験した全ての*S.cerevisiae*の株で反応をした(図1, レーン6~8)。そこで、*S.servazzii*の*LEU4*相同遺伝子と思われる配列を検討し、F, Rより内側の領域にプライマーSsF, SsRを設計した。その結果、*S.cerevisiae*では反応せずに、*S.servazzii*には反応することが分かった(図1, レーン1~5)。今後は、これらプライマーを用い、種特異的PCR法によ

り、食品中の *S.servazzii* モニタリング技術を展開していきたく考えている。

3.3 2-DG 耐性株を利用した育種

グルコース(Glu)のアナログである 2-DG に対する耐性株では、糖の代謝に関連した様々な形質が報告されている^{9),10)}。そこで、発酵力の強化された株の選択を目的として、2-DG 耐性株の分離を試みた。野生株の混濁液を 2-DG 0.01 %を含む選択培地上に塗布したところ、47 株の耐性株を取得することができた。さらに、0.01 %耐性株のいくつかを選択して、それを培養し、2-DG 0.04 %を含む選択培地上に塗布したところ、17 株の耐性株を取得することができた。同様に 0.04 %耐性株から 2-DG 0.10 %耐性株を、10 株取得することができた(一次スクリーニング)。

本研究では、唯一の炭素源としてガラクトース(Gal)を用いている。そのため、2-DG 耐性株は、Gal に対する発酵性能が高まっていることが想定されたので、Gal を糖源とした培地で発酵試験を行ったところ、2-DG 耐性株中には発酵性能が高い株を多数確認することができた(表 3)。また、Glu に対しても高い発酵力を有する 2-DG 耐性株を探索するために、Glu を糖源とした培地で発酵試験を行った。2-DG 耐性株は、野生株と比較すると、発酵力が同等か低いものが多数を占めたが、5 %程高い発酵力を有する株(*ser003*)が得られた。

一次スクリーニングの結果得られた有望株に関し、さらにパン酵母としての適性を見るためにガス発生量の測定を行った。その結果、親株が 90 分間に 21 ml のガスを発生させたのに対し、*ser003* 株は 24 ml 発生させた。エタノール生産量のみならず炭酸ガス生産量も、*ser003* 株では、親株を上回っていたので、この株により製パン試験を行うことにした。

3.4 製パン試験

野生株と改良した変異株により製パン試験を行った。変異株としては、5 %ほど発酵力が強化された *ser003* 株と、IAA 生産量の増加した T-1 株を用いた。大幅な機能改善を果たすには至らな

表3 発酵力試験

	galactose	glucose
野生株	1	1
<i>ser002</i>	0.913	0.976
<i>ser003</i>	1.043	1.049
<i>ser004</i>	0.946	0.683
<i>ser005</i>	0.946	0.78
<i>ser021</i>	1.011	0.748
<i>ser022</i>	0.978	0.878
<i>ser023</i>	0.88	0.748
<i>ser024</i>	1.174	0.659
<i>ser025</i>	1.239	0.707
<i>ser031</i>	1.045	0.509
<i>ser032</i>	0.795	0.226
<i>ser033</i>	1.023	0.642
<i>ser035</i>	0.864	0.547
<i>ser036</i>	0.682	0.509

野生株の生産したエタノール量を 1.000 として、相対値により表した。

かったものの、野生株と比較して、焼き上がり時の比容積の上昇と、風味の変化を感じられるパンができた(表 4)。

製パン試験に使う野生株の酵母量を変化させることにより、よりよい酵母量の条件を求めめるため、酵母(野生株)の量を強力粉の重量に対して 2 %または 4 %にして製パン適性を比較した。その結果、酵母量を倍にした 4 %のものが、2 %使用の試験パンよりも一次、二次発酵がよく進み、三次発酵時間が短縮され、焼き上がり時の比容積も大きくなった(表 5)。

4.まとめ

(1) *S.servazzii* の TFL 耐性株より、これまでに知られていない性質をもつ株を分離した。この株は、IAA 生産量及び酵素活性の測定より、Leu の菌体内への取り込み異常株ないし IAA への生合成異常株である可能性が解明された。

(2) *S.servazzii* 特異的 PCR プライマーの設計を行った。*S.servazzii* 特異的 PCR 法により、食品中における *S.servazzii* の消長をモニタリングしていくことが可能となった。

(3) 2-DG 耐性株の分離を行った。耐性株には Gal や Glu の発酵力が親株よりも上昇している

表4 野生株と育種株の製パン試験

酵母	生地膨張量 (ml)		三次発酵時間 (min)	パン		
	一次	二次		重量 (g)	体積 (ml)	比容積 (ml / g)
野生株	200	150	112	503.0	1550	3.08
ser003	200	150	112	508.5	1600	3.15
T-1	200	170	112	501.0	1580	3.15

表5 酵母量を変化させた時の製パン試験

酵母量	生地膨張量 (ml)		三次発酵時間 (min)	パン		
	一次	二次		重量 (g)	体積 (ml)	比容積 (ml / g)
2%	200	150	112	503.0	1550	3.08
4%	300	180	66	501.8	1660	3.31

ものがみられた。そのうちの1株では、エタノールのみならず、炭酸ガスの生産量も増加していた。(4)野生株ならびに育種株により、製パン試験を行った。従来の天然酵母で作られたパンと比較して、発酵力・香気成分ともに遜色のない試作品となった。今回確立された製パン技法・評価法を用いて、*S.servazzii* による製パン製造の実用化を目指していきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御助言を賜りました独立行政法人理化学研究所の鈴木基文 前任研究員、国立大学法人埼玉大学地域共同センター加藤司郎氏、また、株式会社日清製粉グループ本社基礎研究所の皆様、独立行政法人理化学研究所遺伝生化学教室の皆様 に深謝いたします。

参考文献

1) 加藤司郎, 中瀬崇: 窒素ガス充填法による塩漬大根漬液の酵母フローラの消長, 日食工誌, **33**, (1986) 659
 2) 加藤司郎, 北村英三, 大島貞雄: 塩漬大根より分離した *Debaryomyces hansenii* および *Saccharomyces servazzii* の生育に影響する因子, 日食工誌, **38**, (1991) 357
 3) 富永達矢, 奥沢洋平: 分子生物学的手法を用いた新規酵母の開発, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **1**, (2003) 107

4) Ulm E.H., Böhme R. and Kohlhaw G. : α -isopropylmalate synthase from yeast : purification, kinetic studies, and effect of ligands on stability., J.Bacteriol., **110**, (1972) 118
 5) 西谷尚道: 国税庁所定分析法注解, (1974) 486
 6) 改訂「パン用酵母試験法」: 日本イースト工業会, (1987)
 7) Ashida T., Ichikawa E., Suginami K., and Imayasu S. : Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component., Agric. Biol. Chem., **51**, (1987) 2061
 8) Yoshikawa S., Oguri I., Kondo K., Fukuzawa M., Shimosaka M. and Okazaki M. : Enhanced formation of isoamyl alcohol in *Zygosaccharomyces rouxii* due to elimination of feedback inhibition of α -isopropylmalate synthase., FEMS Microbiol. Lett., **127**, (1995) 139
 9) 水野昭博, 岩淵正文, 木曾邦明, 佐藤和夫, 高橋利郎: 2-デオキシグルコース耐性株からのリンゴ酸高生産清酒酵母の分離, 醸協, **97**, (2002) 228
 10) 森屋和仁: 高アルコール生産性酵母の育種, 醸協, **84**, (1989) 389