

パン酵母の凍結障害と冷凍耐性酵母の特性

奈良女子大学生活環境学部食物科学講座

教授 河合 弘康

まえがき

パンは小麦粉、砂糖、油脂、食塩などを主な材料として、これに水とパン酵母を加えて機械的に混捏し、形成されたパン生地 (dough) を発酵させたのち焼成した加工食品である。焼成直後のパンは、生地の発酵・熟成過程で生成した種々の揮発性代謝産物や、焼成過程における熱化学反応によって生成した特有の好ましいフレーバーとテクスチャーを保持しているが、これらの性質は時間の経過とともに急速に失われていく。パンが野菜、果実、魚介類などとともに、生鮮食品の一つに位置付けられる理由はここにある。

近年、わが国ではパンに対する消費者の嗜好が高級志向、多品種志向となってきたが、特にパンの生命ともいえる鮮度に対する要望は強く、このような消費者の要求に応えるために、ベーカリーは製パン工程や製品管理に様々な工夫をこらしている。なかでも、冷凍生地を使用する冷凍生地製パン法は、新鮮な焼きたてのパンを店頭で販売できる利点があり、この方法を採用する店舗が増加している。冷凍生地製パン法というのは、製パン工程の途中でパン生地を一時冷凍し、必要に応じて解凍して焼成する方法であり、これによって新鮮な製品を提供することができるうえ、製パンスケジュールの円滑化や労務の省力化が図れるなどの長所がある。しかし、この方法は、生地の冷凍貯蔵中にパン酵母が凍結障害を受け、解凍後の発酵時間が著しく長くなり、その結果容積に乏しく、風味や内相の面で好ましくない製品となる欠点をもっている。¹⁻³⁾ したがって、冷凍生地を用いて品質のよいパンを製造するために、生地の冷凍工程で進行する酵母の凍結障害をできるだけ抑制する工夫が必要である。例えば、酵母の凍結障害を緩和する糖、油脂、界面活性剤などの配合割合を増加したり、酵母の使用量を通常より多くして解凍後の発酵力を保持するなどの方法が採用されている。

一方、通常のパン酵母に比べて冷凍に対して抵抗性の強い冷凍耐性酵母が近年使用されるようになり、これによって冷凍生地製パン法の欠点が克服されるようになった。冷凍生

빵효모의 동결장애와 냉동내성효모의 특성

HIROYASU KAWAI(河合弘康)

(Nara Women's University, JAPAN)

I. 서 론

빵은 밀가루, 설탕, 유지, 식염 등을 주재료로 하며, 여기에 물과 빵효모를 가해 기계적으로 반죽하여 형성된 빵생지(dough)를 발효시킨 후 소성한 가공식품이다. 소성직후의 빵은 생지의 발효, 숙성과정에서 생성된 각종 휘발성 대사산물과 소성과정의 역화학반응에 의해 생성된 특유의 바람직한 flavor와 texture를 보유하고 있으나, 이 성질은 시간이 경과하면서 급속히 소실된다. 빵이 야채, 과일, 어패류 등과 함께, 신선식품의 하나로 여겨지는 이유가 여기에 있는 것이다.

근년, 일본에서는 빵에 대한 소비자의 기호가 고급 지향, 다품종 지향으로 되어가고 있으며 특히 빵의 생명이라고도 할, 선도에 대한 요망은 강하고, 이러한 소비자의 요구에 응하기 위해, bakery는 제빵공정이나 제품관리에 다양한 연구를 기울이고 있다. 그 중에서도 냉동생지를 사용하는 냉동생지 제빵법은, 신선한 갓 구운 빵을 점두에서 판매한다는 장점이 있어, 이 방법을 채택하는 점포가 증가하고 있다. 냉동생지 제빵법이라는 것은, 제빵공정 도중에 빵생지를 일시 냉동해, 필요에 따라 해동시켜 소성하는 방법으로, 이것에 의해 신선한 제품을 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 제빵 스케줄의 원활화나 노무의 생략화가 가능하다. 그러나 이 방법은 생지의 냉동저장 중에 빵효모가 동결 장애를 받아 해동 후의 발효시간이 현저하게 길어져, 그 결과로 용적이 부족하며, 풍미나 내상의 면에서 바람직하지 못한 제품이 된다¹⁻³⁾. 따라서, 냉동생지를 써서 품질이 좋은 빵을 제조하기 위해서는 생지의 냉동공정에서 진행되는 효모의 동결장애를 되도록 억제하는 연구가 필요하다. 예를 들면, 효모의 동결장애를 완화하는 당, 유지, 계면활성제 등의 배합비율을 증가시킨다던가, 효모의 사용량을 보통보다 조금 많이 넣어 해동후의 발효력을 보유하는 등의 방법이 시도되고 있다.

한편, 통상의 빵효모와 비교해 냉동에 대해 저항성이 강한 냉동내성효모를 사용하는 방법도 있으며, 이것에 의해 냉동생지 제빵법의 결점이 극복되었다. 냉동생지 전용의 냉동내성효모는 널리 자연계에서의 검색, 보존 균주로부터의 선발이나 육종에 의하여 얻어져, 현재 상업용으로 적당한 냉동내성효모가 개발되어 실용화되고 있다.

이같이, 냉동내성효모의 개발연구가 행하여 지고있는 한편에선, 효모의 동결장애 요인이나 냉동내성기구에 대해서는 연구도 활발히 행해지고 있다. 이번에는 빵효모의 장애요인에 대해서 지금까지의 연구를 소개해, 냉동내성효모와 냉동감수성효모를 여러가지 관점에서 비교하여, 냉동내성효모의 특성을 고찰하고자 한다.

地専用の冷凍耐性酵母は、広く自然界からの検索、保存菌株中からの選抜や育種によって得られており、現在すでに商業用に適した冷凍耐性酵母が開発され実用に供されている。

このように、冷凍耐性酵母の開発研究が行われる一方、酵母の凍結障害要因や冷凍耐性機構についての研究も活発に行われている。今回は、パン酵母の冷凍障害要因についてこれまでの研究を紹介し、冷凍耐性酵母と冷凍感受性酵母を種々の観点から比較し、冷凍耐性酵母の特性を考察してみたい。

1. 酵母の凍結障害因子とパン生地の凍結貯蔵性

一般に、微生物の凍結障害は、凍結速度、凍結貯蔵温度および期間、解凍速度などの温度条件によって大きな影響を受けるが、その他に凍結溶媒の種類と濃度、微生物の種類、培養条件、菌体濃度などによっても凍結障害の程度が左右される。⁴⁾ パン酵母が生地あるいは溶液中で凍結された場合、その生存能や増殖能、発酵能など本来の生理機能が著しく低下する原因もこれら諸要因の影響がきわめて大きいことが知られている。特に、パン生地中における酵母の凍結障害は、酵母が小麦粉という特殊な環境に置かれているため一層複雑な影響を受けることが予想される。

通常の圧搾パン酵母は、5℃前後で保存すれば数週間程度は製パンに使用できる活性を維持している。これを-20℃で1年間凍結しても酵母の生存率は90%近い値を示し、パン生地中における発酵力と生存率はほぼ一致している。⁵⁾ このようにパン酵母が高い凍結貯蔵性を示す理由は、培養工程の最終段階で酵母の熟成処理が行われ、集菌される酵母がほとんど出芽していない休眠状態の酵母であるため、このような状態の酵母は冷凍に対して強い耐性を持っている。しかし、この圧搾酵母を合成培地中で数時間発酵させた後凍結貯蔵すると、その発酵能は1週間後にはもとの10%以下に低下する。⁶⁾ これに対して、凍結したパン生地中での酵母の解凍後の発酵能は、凍結条件などの要因のほかに生地配合組成や凍結前に行う発酵（以下前発酵と呼ぶ）の有無によって著しい影響を受けることが知られている。例えば、副材料として糖、油脂、乳製品などを多く使用するクロワッサン、デニッシュペストリー、バタロールなど小型でリッチなパンに用いられる生地は、凍結貯蔵後でもかなりの発酵力を保持しており、冷凍生地による製パンにほとんど問題は起こらない。²⁾ しかし、食パンやフランスパンのように糖や油脂類の使用量が少ないか、あるいはまったくそれらを添加しないパン生地中では、生地発酵の有無によって酵母の凍結障害は大きな影響を受ける。図1は無発酵および発酵生地の凍結貯蔵期間と生地発酵力、生地膨張力との関係を示したもので、無発酵冷凍生地では12週間の貯蔵後でも

1. 효소의 동결 장애인자와 빵생지의 동결저장성

일반적으로, 미생물의 동결장애는 동결속도, 동결저장온도 및 기간 해동속도 등의 온도 조건에 의해 큰 영향을 받으나, 그 외에도 동결 용매의 종류와 농도, 미생물의 종류, 배양조건, 균체농도 등에 의해서도 동결장애의 정도가 좌우된다⁴⁾. 빵효소가 생지 또는 용액 중에서 동결된 경우, 그 생존능이나 증식능, 발효능 등 본래의 생리기능이 현저하게 저하되는 점도 이들 세요인의 영향이 대단히 크다는 것을 알 수 있다. 특히, 빵생지 중에 있어서 효소의 동결 장애는, 효소가 밀가루라는 특수한 환경에 처해있기 때문에 한층 복잡한 영향을 받을 것으로 예상된다.

통상의 압착 빵효모는, 5°C 전후에서 보존하면 수주간 정도는 제빵 가능한 활성을 유지하고 있다. 이것을 -20°C 에서 1년간 동결해도 효모의 생존률은 90% 가까워 빵생지 중에 있어서의 발효력과 생존률은 거의 일치하고 있다⁵⁾ 이같이 빵효모가 높은 동결저장성을 나타내는 이유는, 배양공정의 최종단계에서 효모의 숙성처리가 행해져, 집균되는 효모가 거의 출아되지 않은 휴면상태의 효모이므로, 이러한 상태의 효모는 동결에 대해서 강한 내성을 갖고 있다.

그러나, 이 압착효모를 합성배지 중에 수시간 발효 시킨 후 동결저장하면, 그 발효능은 1주간 후에는 처음의 10% 이하로 저하된다⁶⁾. 이것에 반해, 동결한 빵반죽 중의 효모의 해동후의 발효능은, 동결조건 등의 요인 외에, 반죽 배합 조성이나 동결전에 행하는 발효(이하 전발효라고 함)의 유무에 의해 현저한 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

예를 들면, 부재료로 당, 유지, 유제품 등을 많이 사용하는 크로와쌍, 데니슈페이스트리, 버터를 등 크기가 작으며 부재료를 많이 쓴 빵에 사용되는 생지는, 동결저장 후에도 상당한 발효력을 보유하고 있으며, 냉동생지에 의한 제빵에 거의 문제가 없다²⁾. 그러나 식빵이나 프랑스빵 같이 당이나 유지류의 사용량이 적거나, 또는 전혀 그것들을 첨가 안한 빵생지 중에서는, 생지 전발효의 유무에 의해 효모의 냉동장애는 큰 영향을 받는다. 그림 1은 무발효 및 발효생지의 동결저장 기간과 생지발효력, 생지팽창력과의 관계를 나타낸 것으로, 무발효 냉동 생지에서는 12주간의 저장 후에도 거의 발효력의 저하가 일어나지 않으나, 동결하기 전에 2시간 전 발효시킨 냉동생지에서는 단시간에 효모에 동결장애가 일어나, 잔존 발효력이 현저하게 저하한다⁵⁾.

그림 2는 전발효 시간의 길이가 해동후의 생지발효력에 미치는 영향을 나타내고 있다. 냉동생지의 해동 후 2시간의 발효에 의한 가스 발생량을 동결전의 해당시간에 있어서의 발효력과 비교하여 보면 전발효 시간이 30분 이내가 되면 냉동생지의 발효력은 급격히 감소해, 1시간 이상에서 효모의 동결장애가 현저하게 증대되었다. 이 이유는, 반죽한 빵생지 중의 효모는 발효개시 후 즉시 대사 활동을 시작해, 세포의 출아가 개시되어 활성화 상태가 되며, 이 상태의 효모가 동결에 의해 장애를 받기 쉬운 때문으로 생각되어 진다. 또 발효에 의해 생지중에 생성·축적되는 에탄올이나 휘발성 유기산도 효모의 동결장애를 촉진한다. 발효의 주요산물인 에탄올에 대해 보면, 발효생지 중에 생성하는 52% 정도의 에탄올은 휴지기의 효모에 대해서는 동결저장 후의 발효력에 거의 영향을 미치지 않으나, 출아를 개시한 활성화 효모에 대해서는 강한 장애를 일으키게 한다. 결국, 빵생지 중에 효모에 강한 동결장애가 일어나기 위해서는 3개의 요인, 즉 활성화 효모, 밀가루, 에탄올의

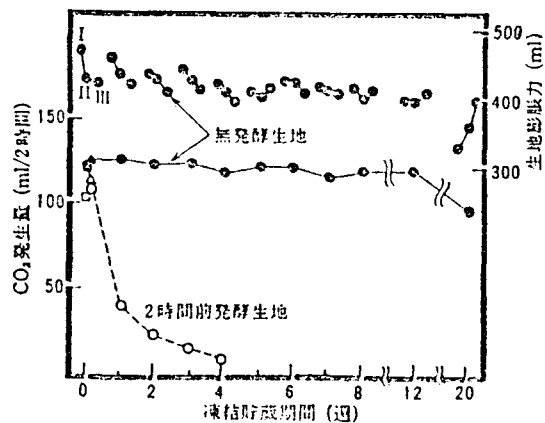


図1 無発酵および前発酵生地凍結貯蔵中における酵母の発酵能変化⁽²⁾
 □: 非凍結生地, △: 一旦凍結後、直ちに解凍した生地, ●, ○: 依随に示した期間凍結貯蔵した生地. 生地膨張力の測定はイースト工業会法による, 小麦粉 20g を使用した食パン生地を用いた. 冷凍条件: -20°C .
 I: 第1発酵 (80分), II: 第2発酵 (50分), III: 第3発酵 (50分) 後の生地膨張力

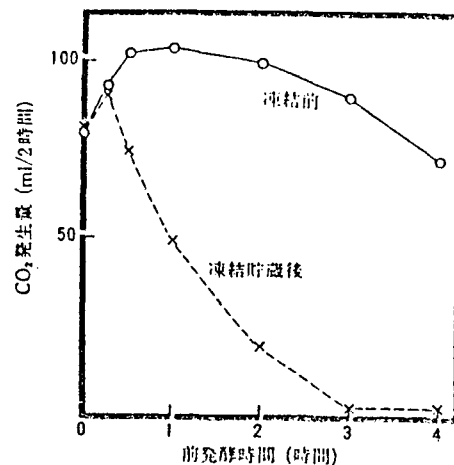


図2 前発酵時間の長さが冷凍生地解凍後2時間の酵母の発酵能に対して与える影響⁽²⁾

ほとんど発酵力の低下が認められないが、凍結する前に2時間前発酵させた冷凍生地では短期間で酵母に凍結障害が起こり、残存発酵力が著しく低下する。⁵⁾ 図2は前発酵時間の長さが解凍後の生地発酵力に及ぼす影響を示している。⁵⁾ 冷凍生地の解凍後2時間の発酵によるガス発生量を、凍結前の相当時間における発酵力と比較すると、前発酵時間が30分以上になると冷凍生地の発酵力は急激に減少し、1時間以上で酵母の凍結障害が著しく増大する。この理由としては、捏ねあげたパン生地中の酵母は発酵開始後直ちに代謝活動を始め、やがて細胞の出芽が開始されて活性化状態となり、この状態の酵母が凍結によって障害を受けやすいためと考えられている。また、発酵によって生地中に生成蓄積するエタノールや揮発性有機酸も酵母の凍結障害を促進する。発酵の主要産物であるエタノールについて見ると、発酵生地中に生成する1-2%程度のエタノールは休止酵母に対しては凍結貯蔵後の発酵力にほとんど影響を及ぼさず、出芽を開始した活性化酵母に対して強い障害を与える。結局、パン生地中で酵母に強い凍結障害が起こるためには、3つの要因、すなわち活性化酵母、小麦粉、エタノールの共存が必要であることが明らかにされている。⁵⁾

2. 冷凍耐性酵母の開発とその発酵特性

以上述べたように、普通のパン酵母はパン生地中で強い凍結障害を受け、解凍後の発酵

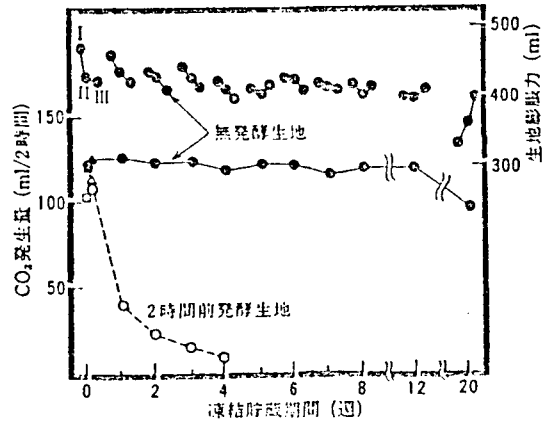


Fig. 1. 물발효 및 전발효생지의 동결 저장중에 있어서의 효모의 발효능 변화.

■, □: 비동결 생지.

▲, △: 일단 동결후, 즉시 해동한 생지

●, ○: 횡축으로 나타낸 기간 동안 동결 저장한 한생지

생지 팽창력의 측정을 이스트공업회법에 의해, 밀가루 20g을 사용한 식빵생지를 사용함. 동결조건: -20°C

I: 제 1발효(80분) II: 제 2발효(50분)

III: 제 3발효(50분)후의 생지 팽창력

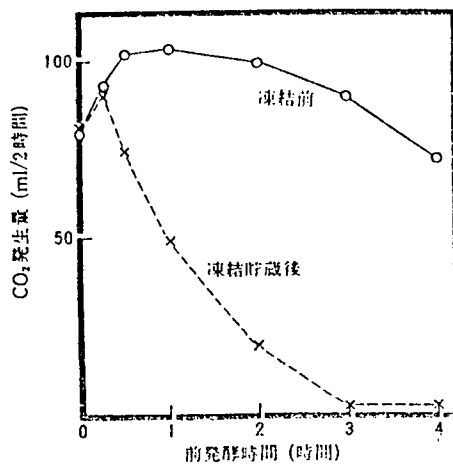


Fig. 2. 전발효 시간의 길이가 냉동생지 해동후 2시간 동안 효모의 발효능에 준 영향.

공존이 필요한 것으로 밝혀졌다⁵⁾.

2. 냉동내성효모의 개발과 그 발효특성

이상에서 말한 바와 같이, 보통의 빵효모는 빵생지 중에서 강한 동결장해를 받아, 해동 후의 발효력이 현저히 저하하므로 충분한 발효를 필요로 하는 빵의 제조에 냉동생지법은 적용되지 못한다.

力が著しく低下するので、十分な発酵を必要とするパンの製造に冷凍生地法は適用できない。この方法は従来から、酵母の凍結障害に対して保護作用をもつ砂糖、油脂、脱脂粉乳卵などの副材料を多く配合した菓子パン類の製造に限って適用されてきた。このような製パン条件では、解凍後でも十分に膨らんだパンが得られるが、フレーバーやテクスチャーの点で劣る製品しか得られないという欠点がある。これらの問題を解決するために、冷凍生地に適したパン酵母、つまり冷凍前に十分な発酵を行っても凍結障害を受けにくい冷凍耐性酵母の探索がパン酵母メーカーや研究機関によって行われ、冷凍生地専用のパン酵母が商品化されている。

冷凍耐性酵母は自然界に生息する野性酵母や保存菌の中からの検索や、それらの性的交雑、細胞融合などの育種によって得られている。その中には、パン酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces thermotolerance*、*Torulaspota delbrueckii* (旧名 *Saccharomyces rosei*)⁷⁻¹¹⁾ などが含まれている。市販の普通パン酵母 (CY) と冷凍耐性酵母 (CFY, FRI-413, FRI-802, FRI-501) を用いて作った食パン生地の解凍後の発酵力と前発酵時間との関係を図3に示す。⁹⁾ 普通パン酵母 CY を用いた冷凍生地の解凍後の発酵力は、前発酵時間が長くなるにつれて減少し、前発酵90分で残存発酵力は約15%に激減している。市販冷凍耐性酵母CFYおよびFRI-802も同様に前発酵時間の増加とともに解凍後の発酵力は減少するが、その程度はCYに比べて小さく、90分の前発酵で約70%の残存発酵力を保持している。これに対して、FRI-413およびFRI-501の2株では、前発酵時間を長くすると解凍後の発酵力がむしろ増加する特徴が見られ、他の菌株より明らかに冷凍に強い性質を持っている。筆者らが自然界から分離した *Torulaspota delbrueckii* に属する酵母D2-4も90分の前発酵によって解凍後の発酵力にほとんど影響が見られなかった。¹⁰⁾ このように、冷凍生地において強い発酵力を示す菌株が多く見いだされているが、冷凍耐性ととも、フランスパンのような砂糖無添加のパン生地の発酵能や、30%前後の砂糖を使用する菓子パン生地の発酵能も冷凍生地用酵母の性質として望まれており、これらの性質を兼ね備えた酵母菌の開発研究が現在進められている。

3. 冷凍耐性酵母の生化学的特性

前述のように、冷凍耐性酵母には十分に前発酵を行った後に凍結したほうが解凍後の発酵力が無発酵生地のそれより大きくなるタイプと、前発酵時間の増大とともに解凍後の発酵力が減少するが、その低下の程度が小さいタイプの2種類がある。このように冷凍に対

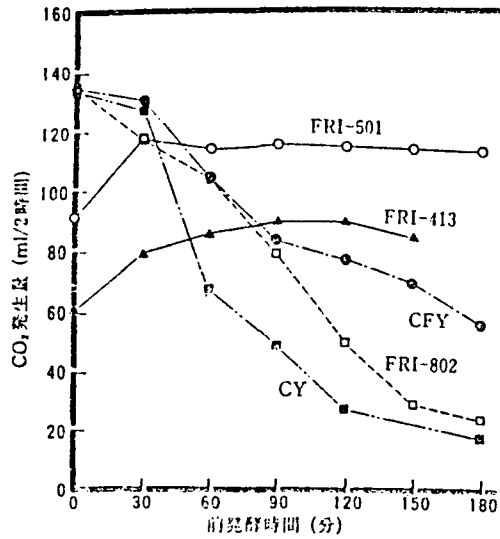


Fig. 3. 각종 냉동내성 빵효모와 시판 빵효모를 사용한 전발효 냉동생지의 해동후의 발효력 밀가루 20g을 사용한 식빵생지. 냉동조건: -20°C , 7일간

이 방법은 종래부터, 효모의 동결장해에 대해 보호작용을 갖는 설탕, 유지, 탈지분유, 계란 등의 부재료를 많이 배합한 과자빵류의 제조에 한해서 적용되어 왔다. 이같은 제빵조건에서는, 해동후에도 충분히 부풀 빵이 얻어지나, flavor나 texture면에서는 떨어지는 제품이 얻어진다는 결점이 있다. 이 문제를 해결하기 위해, 냉동생지에 적당한 빵효소, 즉 냉동전에 충분한 발효를 행해도 동결장해를 받기 어려운 냉동내성효모의 탐색이 빵효모 메이커나 연구기관에 의해 행해져 냉동생지 전용의 빵효모가 상품화 되고 있다.

냉동내성 효모는 자연계에 서식하는 야생효모나 보존 규종에서의 검색, 그들의 성적교배, 세포융합 등의 육종에 의해 얻어지고 있다. 그 중에는 빵효모와 동종의 *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces thermotolerance*, *Torulasporea delbrueckii*(구명 *Saccharomyces rosei*)⁷⁻¹¹ 등이 포함되어 있다. 시판의 보통 빵효모(CY)와 냉동내성효모(CFY, FRI-413, FRI-802, FRI-501)을 사용해 만든 식빵 생지의 해동후의 발효력과 전발효 시간과의 관계를 그림 3에 나타내었다⁸. 보통 빵효모 CY를 사용한 냉동생지의 해동후의 발효력은, 전발효시간이 길어짐에 따라 감소하여 전발효 90분에서 잔존 발효력은 약 15%로 격감한다. 시판 냉동내성효모 CFY 및 FRI-802도 마찬가지로 전발효 시간의 증가와 더불어 해동후의 발효력은 감소하나, 그 정도는 CY에 비해 적으며, 90분의 전발효에서 약 70%의 잔존발효력을 보유하고 있다. 여기에 반해, FRI-413 및 FRI-501의 2株에서는 전발효시간을 길게하면 해동 후의 발효력이 오히려 증가하는 특징이 보여, 다른 균주보다 명백히 냉동에 강한 성질을 갖고 있다. 필자 등의 자연계에서 분리한 *Torulasporea delbrueckii*에 속하는 효모 D₂₋₄도 90분의 전발효에 의해 해동후의 발효력은 거의 영향을 받지 않았다¹⁰. 이와 같이, 냉동생지에 있어서 강한 발효력을 나타내는 균주가 많이 발견되었으나, 냉동내성과 동시에, 프랑스빵 같이 설탕 무첨가 빵생지의 발효능이나,

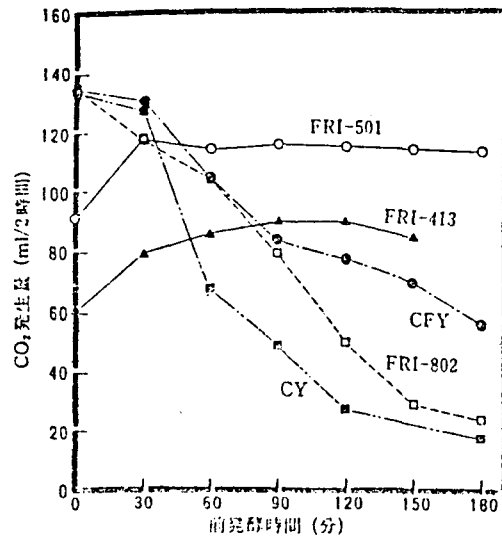


図3 ■各種冷凍耐性パン酵母と市販パン酵母を用いた前発酵冷凍パン生地が解凍後における発酵力⁽¹⁾
小麦粉20gを使用した食パン生地。冷凍条件：-20℃, 7日間

して強い耐性をもつ酵母と、普通のパン酵母のように冷凍に感受性を示す酵母にはどのような生化学的特徴と相違があるのだろうか。冷凍耐性酵母に共通する主な特徴についてこれまで明らかにされている点をまとめると次のようになる。

- 1) 液内およびパン生地中での凍結・融解後の生存率が高い。
- 2) 酵母のサイズが比較的小さい。
- 3) 小麦粉とエタノール共存下で凍結しても発酵力が大きな影響を受けない。
- 4) 酵母の発酵を阻害する小麦由来のタンパク質ピューロチオニンに対する感受性が低い。
- 5) 凍結・融解による酵母細胞膜の損傷程度が少なく、細胞内物質の菌体外への漏洩量が少ない。
- 6) 細胞内貯蔵物質トレハロースの含量が多い。

酵母を氷点下に保った場合、細胞は過冷却、細胞外凍結、細胞内凍結のいずれかの状態に置かれる。過冷却状態にある酵母の生理活性はそのまま維持され、細胞外凍結の状態では細胞内水分の脱水が起こるが、解凍によって復水し酵母は元の状態に復帰できる。¹²⁾ 一方、細胞内凍結は酵母に対して致命的な影響を与え、氷晶の形成による細胞組織の破壊が凍結障害の原因の一つであると推定されている。酵母が上記のいずれの状態に置かれるかは主として冷却速度と最低到達温度によって決定され、したがって酵母の生理活性はこ

30% 전후의 설탕을 사용하는 과자빵생지의 발효능도 냉동생지용 효모의 성질로서는 필요하므로, 이들 성질을 함께 갖는 효모균의 개발연구가 현재 진행되고 있다.

3. 냉동내성효모의 생화학적 특성

전술한 바와 같이, 냉동내성 효모에는 충분히 전발효를 행한 후에 동결하는 편이 해동 후의 발효력이 무발효 생지의 발효력보다 크게 되는 종류와, 전발효 시간의 증대와 더불어 해동 후의 발효력이 감소하나 그 저하의 정도가 적은 종류의 2가지가 있다. 이같이 냉동에 대해 강한 내성을 갖는 효모와, 보통의 빵효모같이 동결에 감수성을 나타내는 효모와는 생화학적으로 어떻게 상이한가. 냉동내성 효모에 공통되는 주요 특징에 대해 지금까지 밝혀진 점을 요약하면 다음과 같다.

- 1)액내 및 빵생지 중에서 동결, 융해 후의 생존률이 높다.
- 2)효모의 사이즈가 비교적 작다.
- 3)소맥분과 에탄올 공존하에 동결해도 발효력이 큰 영향을 받지 않는다.
- 4)효모의 발효를 저해하는 밀가루 유래의 단백질 purothionin에 대한 감수성이 낮다.
- 5)동결·융해에 의한 효모세포막의 손상 정도가 적어, 세포내 물질의 균체외로의 누설량이 적다.
- 6)세포내 저장물질 trehalose의 함량이 많다.

효모를 빙점하에 두었을 경우, 세포는 과냉각, 세포의 동결, 세포내 동결의 어느 한 상태에 놓여진다. 과냉각 상태에 있는 효모의 생리 활성은 그대로 유지되어 세포의 동결의 상태에서는 세포내 수분의 탈수가 일어나, 해동에 의해 수복해 효모는 원래 상태로 복귀된다.

한편, 세포내 동결은 효모에 대해 치명적인 영향을 주어, 빙정의 형성에 의한 세포조직의 파괴가 동결장해의 원인의 하나로 추정되고 있다. 효모가 위의 어느 한 상태에 놓여지느냐는 주로 냉각 속도와 최저도달 온도에 의해 결정되어, 따라서 효모의 생리활성은 이들 동결조건에 의해 크게 좌우된다고 생각된다. 미생물의 크기와 동결내성과의 관련에 대해서는, 세포의 크기가 비교적 작을수록 냉동내성이 크며, 그 이유로 세포의 수분투과성, 탈수속도가 중요한 요인이라고 생각되어진다¹³⁾. 상기의 냉동내성 효모의 특성중, 특히 냉동내성과 밀접한 관계를 갖는다고 생각되어진 점을 소개한다.

(1) 소맥분 및 에탄올의 공존하에 있어서의 냉동내성

통상, *Saccharomyces*속 효모의 발효대사 산물인 에탄올은, 효모의 발효나 증식에 영향을 주어 10% 이상의 고농도가 되면 그 생육이 현저하게 저하된다¹⁴⁾. 효모세포에 대한 에탄올의 독성은 세포막의 구조나 기능에 대한 작용결과로 나타나, 특히 세포막 지질이 에탄올 독성의 주요 타겟이 되고 있다. 발효빵생지 중의 에탄올은 비교적 저농도이나, 냉동에 의해 빵생지의 수분이 빙결하면, 효모세포내 수분의 탈수, 농축이 일어나, 그 결과 세포내외의 에탄올 농도가 상승하기 때문에 효모의 세포막이 손상을 받기 쉽다고 추정된다. 냉동내성 효모는 그러한 조건하에서도 발효능에 치명적인 영향을 받지 않는 점에서, 냉동감수성 효모의 세포막과는 다른 성질을 갖고 있다고 생각되어진다.

냉동내성 효모 FRI-413과 *T. delbrueckii* 및 시판 빵효소 CY의 밀가루와 에탄올 공존하에 냉동

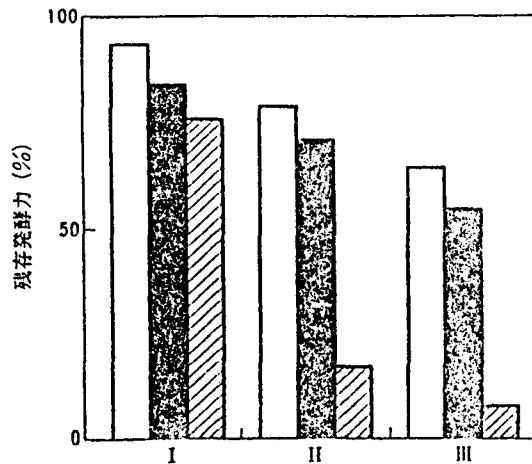


図4 ■ 各種冷凍耐性酵母の冷凍耐性に及ぼすアルコールの影響⁽¹²⁾

I : 小麦粉単独生地, II : 小麦粉+エタノール(1%)生地, III : 前発酵2時間食パン生地. いずれも -20°C , 7日間冷凍貯蔵
 □ : *T. delbrueckii*, ■ : FRI-413, ▨ : CY

れら凍結条件によって大きく左右されるものと考えられる。微生物の大きさと凍結耐性との関連については、細胞の大きさが比較的小さいものほど冷凍耐性が大きく、その理由として細胞の水分透過性、脱水速度が重要な要因となっていると考えられる。¹³⁾ 上記の冷凍耐性酵母の特性のうちで、特に冷凍耐性と密接な関係を持つと思われる点を紹介する。

(1) 小麦粉およびエタノールの共存下における冷凍耐性

通常、*Saccharomyces* 属酵母の発酵代謝産物であるエタノールは、酵母の発酵や増殖に影響を与え、10%以上の高濃度になるとその生育が顕著に阻害される。¹⁴⁾ 酵母細胞に対するエタノールの毒性は細胞膜の構造や機能に対する作用結果として現われ、とくに細胞膜脂質がエタノール毒性の重要なターゲットになっていると考えられている。発酵パン生地中のエタノールは比較的低濃度であるが、冷凍によってパン生地の水分が氷結すると、酵母細胞内水分の脱水・濃縮が起こり、その結果細胞内外のエタノール濃度が上昇するため、酵母の細胞膜が損傷を受けやすくなるものと推定される。冷凍耐性酵母はそのような条件下でも発酵能に致命的な影響を受けないことから、冷凍感受性酵母の細胞膜とは異なる性質を持っていると思われる。

冷凍耐性酵母FRI-413と *T. delbrueckii* および普通パン酵母CYの小麦粉とエタノール共存下での冷凍耐性を比較した一例を図4に示す。¹⁵⁾ あらかじめ活性化した酵母菌体を用いてつくった小麦粉単独生地、あるいは小麦粉とエタノール(対小麦粉1%)

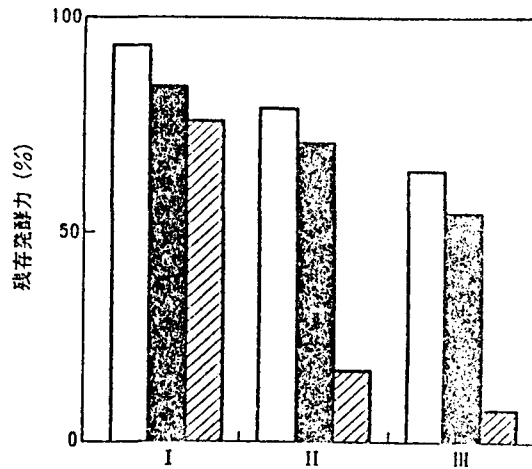


Fig. 4. 각종 냉동내성효모의 냉동내성에 미치는 알콜의 영향
 I: 밀가루단독생지 II:소맥분+에탄올(1%)생지
 III: 전발효 2시간 한 식빵생지 모두 -20°C , 7일간 냉동저장
 □: *T. delbrueckii* ■: FRI-413 ▨: CY

내성을 비교한 일례를 그림 4에 나타내었다¹⁵⁾. 미리 활성화 시킨 효모균체를 써서 만든 밀가루 단독생지, 밀가루와 에탄올(소맥분에 대해 1%)를 포함한 생지, 그리고 2시간 전 발효시킨 식빵생지를 각각 -20°C 에서 7일간 냉동해, 해동 후의 잔존 발효력을 측정했다. 그 결과, 밀가루 단독생지에 있어서는 3株 모두 발효력의 차이는 근소했으나, 에탄올을 포함한 생지 및 식빵 생지에서는 CY의 발효력이 현저하게 감소했다. 그것에 반해, 냉동내성효모는 높은 잔존 발효력을 보유하고 있어 시판 빵효모보다 에탄올에 대해 강한 내성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

(2) Purothionin내성과 냉동내성

소맥분 중에는 맥주효모의 발효능이나 증식능을 강하게 저해하는 purothionin이라고 불리우는 수용성 단백질이 존재하고 있어, 이것이 맥주 효모에게뿐만 아니라 빵효모에 대해서도 조건에 따라 치사적인 영향을 주는 것으로 보고되어 있다¹⁶⁾. 이 독성 단백질이 효모의 액내동결, 용해 후의 잔존발효력에 주는 영향을 상기의 3군주에 대해 비교하면, purothionin 첨가에 의해 냉동감수성의 빵효모의 잔존발효력을 감소해 0.5 mg/ml에서 발효력은 거의 소실되었다. 이것에 반해, 냉동내성 효모 FRI-413 및 *T. delbrueckii*에서는 동농도의 purothionin 존재하에서도 무첨가의 경우의 80~100% 잔존 발효력을 나타내었다¹⁵⁾. purothionin은 효모의 세포막에 결합해, 막의 물질투과성에 장애를 주는 것으로 생각되어지며¹⁷⁾, purothionin이 효모의 동결장애를 촉진하는 것은, 세포의 동결, 용해 과정에 있어서 세포내외에서 일어나는 수분의 이동에 의해 purothionin의 세포막에의 흡착이 일어나 막기능에 장애를 주는 것으로 추정된다. 이같이 냉동내성 효모가 냉동감수성 효모보다 purothionin에 대해 내성을 나타내는 것은, 양효모의 막의 성질에 어떠한 차이가 있음을 시사하고 있다. 필자들은 자연제에서 분리한 *T. delbrueckii*에 속하는 냉동내성효모 D₂₋₄에서 변이처리에 의해 냉동감수성균

を含む生地、および2時間前発酵させた食パン生地をそれぞれ-20℃で7日間冷凍し、解凍後の残存発酵力を測定した。その結果、小麦粉単独生地においては3株とも発酵力の低下は僅かであったが、エタノールを含む生地および食パン生地ではCYの発酵力が著しく減少した。それに対して、冷凍耐性酵母は高い残存発酵力を保持しており、市販パン酵母よりエタノールに対する強い耐性を持っていることがわかった。

(2) ピューロチオニン耐性と冷凍耐性

小麦粉中にはビール酵母の発酵能や増殖能を強く阻害するピューロチオニン (purothionin) と呼ばれる水溶性タンパク質が存在しており、これがビール酵母だけでなくパン酵母に対しても条件によって致命的な影響を与えることが報告されている。¹⁶⁾ この毒性タンパク質が酵母の液内凍結・融解後の残存発酵力に与える影響を上記の3菌株について比較すると、ピューロチオニンの添加によって冷凍感受性のパン酵母の残存発酵力は減少し0.5 mg/ml でほとんど発酵力が失われた。これに対して、冷凍耐性酵母 FRI-413 および *T. delbrueckii* では同濃度のピューロチオニン存在下でも無添加の場合の80-100%の残存発酵力を示した。¹⁵⁾ ピューロチオニンは酵母の細胞膜に結合し、膜の物質透過性に障害を与えると考えられており、¹⁷⁾ ピューロチオニンが酵母の凍結障害を促進するのは、細胞の凍結・融解の過程において細胞内外で起こる水分の移動によってピューロチオニンの細胞膜への吸着が起り膜機能に障害を与えるものと推定される。このように冷凍耐性酵母が冷凍感受性酵母よりもピューロチオニンに対して耐性を示すことは、両酵母の膜の性質になんらかの差異があることを示唆している。筆者らは、自然界から分離した *T. delbrueckii* に属する冷凍耐性酵母 D2-4 から変異処理によって冷凍感受性株 60B3 を誘導し、¹⁸⁾ 両酵母のピューロチオニン耐性を細胞内物質の漏洩量を指標として比較した。対数期の菌体をピューロチオニンを含むリン酸緩衝液に懸濁して30℃でインキュベートし、経時的に細胞内から漏洩する紫外吸収物質を測定した。図5に示したように、冷凍耐性酵母 D2-4 ではピューロチオニンの有無にかかわらず細胞内物質の緩やかな漏洩が見られたが、冷凍感受性酵母 60B3 ではピューロチオニン無添加でも急激な漏洩が起り、ピューロチオニンの濃度が高くなるにつれて漏洩量も増大した。また、これら2菌株をピューロチオニンとともに凍結・融解した場合も同様の傾向が認められた。凍結・融解による酵母細胞からの漏洩物質の中には、補酵素類、アミノ酸、塩類、糖類、有機酸、ヌクレオチドなどが含まれているが、パン生地の物理的性質に大きな影響を与える物質として還元型グルタチオンが知られている。²⁾ 酵母が凍結障害を受けると

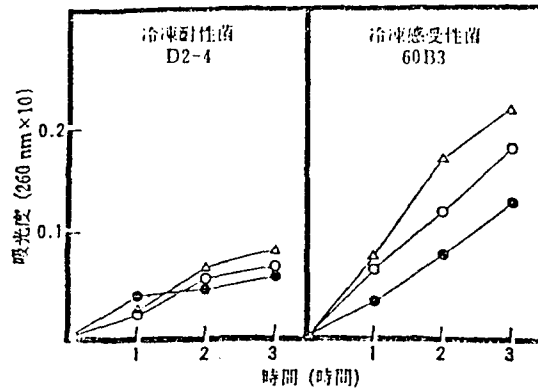


Fig. 5. 효모균체에서의 세포내 자외부 흡수물질의 누설에 미치는 purothionin의 영향 습균체 0.7 mg을 0.05 M의 인산 완충액(pH 7)에 현탁해, 30°C 에서 완전히 진탕했다. purothionin 첨가량 ●: 0, ○: 1, △: 2($\mu\text{g/ml}$)

60B3를 유도해¹⁸⁾, 세포내 물질의 누설량을 지표로하여 양효모의 purothionin 내성을 비교했다. 대수기의 균체를 purothionin을 함유한 인산완충액에 현탁해 30°C 에서 인큐베이션해, 경시적으로 세포내에서 누설하는 자외부 흡수물질을 측정했다. 그림 5에 나타난 바와 같이, 냉동내성 효모 D₂₋₄에서는 purothionin의 유무와 관계없이 세포내 물질의 누설량이 완만했으나 냉동감수성 효모 60B3에서는 purothionin 무첨가에서도 급격히 누설되었으며 purothionin 농도가 높아짐에 따라 누설량도 증대했다. 또 이들 두 균주를 purothionin과 함께 동결, 융해한 경우도 같은 경향으로 나타났다. 동결, 융해에 의한 효모세포에서의 누설물질 중에는 보효소류, 아미노산, 연류, 당류, 유기산, 뉴클레오타이드 등이 함유되어 있으나, 빵생지의 물리적 성질에 큰 영향을 주는 물질로는 환원형 glutathion이 있다²⁾. 효모가 동결장해를 받으면 세포내의 환원형 glutathion의 대부분이 세포외로 누설해, 이것이 빵생지의 변화를 일으키는 원인이 된다. 그 결과, 냉동생지법으로 소성한 빵의 품질저하가 일어난다¹⁹⁾. 전술한 시판빵효모 CY의 활성화 균체를 -20°C 에서 동결저장하면, 저장 1 일째부터 glutathion의 누설이 일어나, 저장시간이 길어짐에 따라 누설량은 더욱 증대되었다. 이것과는 대조적으로, 냉동내성효모 FRI-413이나 *T. delbrueckii*에서는 동조건에서 7일간 동결저장해도 거의 glutathion의 누설은 인정되지 않았으며¹⁵⁾, 이것들 효모는 동결장해를 받기 어려운 막구조를 갖고 있다고 생각된다.

(3) 효모의 세포막지질 조성 and 냉동내성

효모의 세포막의 구조와 기능이 유지되기 위해서는, 막의 지질 2층층의 내부가 액정상태이어야 하며, 저온에서 이 상태가 유지되기 위해서는 인지질의 측쇄지방산이 불포화 지방산일 필요가 있다²⁰⁾. 지금까지의 연구에 의하면 냉동내성 효모와 냉동감수성 효모간에 보이는 동결장해의 차이가, 저온에 있어서 세포막의 손상과 밀접한 관계가 있다고 추정하였다. 따라서, 양효모의 세포막 인지질과 그 구성지방산의 종류와 함량, 구성비율 등을 분석하여 냉동내성과의 관련을 검토하였다. 예를 들어, 냉동감수성의 빵효모와 *Saccharomyces*속에 속하는 냉동내성 효모 FRI-054 및 냉동내성효모 *S.rosei*의

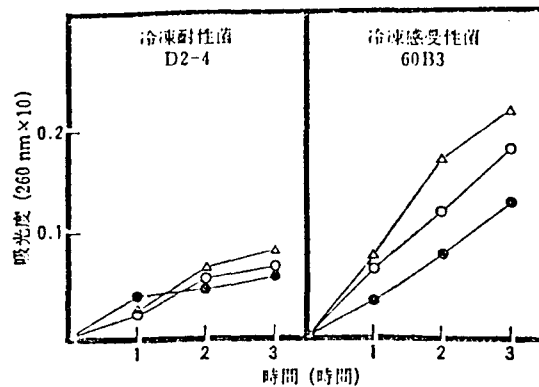


図5 ■酵母菌体からの細胞内紫外外部吸収物質の漏洩に及ぼすピューロチオニンの影響⁽¹⁹⁾
 菌体 0.7 mg を 0.05 M のリン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁し、30°C でゆるやかに振盪した。
 ピューロチオン添加量 ● : 0, ○ : 1, △ : 2 (μg/ml)

細胞内の還元型グルタチオンの大部分が細胞外に漏洩し、これがパン生地の軟化を引き起こす原因となる。その結果、冷凍生地法で焼成したパンの品質低下が起こることが明らかにされている。¹⁹⁾ さきに述べた市販パン酵母CYの活性化菌体を-20°Cで凍結貯蔵すると、貯蔵1日目からグルタチオンの漏洩が起こり、貯蔵時間が長くなるにつれて漏洩量はさらに増大した。これに対して、冷凍耐性酵母FRI-413や*T. delbrueckii*では、同条件で7日間凍結貯蔵してもほとんどグルタチオンの漏洩は認められず、¹⁵⁾ これらの酵母は凍結障害を受けにくい膜構造を有していると考えられる。

(3) 酵母の細胞膜脂質組成と冷凍耐性

酵母の細胞膜の構造と機能が維持されるためには、膜リン脂質二重層の内部が液晶状態にあることが必要であり、低温でこの状態が保持されるためにはリン脂質の側鎖脂肪酸として不飽和脂肪酸の存在が必須である。²⁰⁾ これまでの研究によって、冷凍耐性酵母と冷凍感受性酵母の間に見られる凍結障害の差異が、低温における細胞膜の損傷と密接な関係があると推定されている。そこで、両酵母の細胞膜リン脂質とその構成脂肪酸の種類と含量、構成比率などの分析が行われ、冷凍耐性との関連が検討されている。例えば、冷凍感受性のパン酵母と*Saccharomyces*に属する冷凍耐性酵母FRI-054および冷凍耐性酵母*S. rosei*の脂肪酸組成を比較すると、冷凍耐性酵母の方が冷凍感受性酵母よりも全脂肪酸含量が多く、その差は不飽和脂肪酸によることが明らかにされている。また、不飽和脂肪酸のうちリノール酸の量に差があり、とくに*S. rosei*のリノール酸含量がパン酵母の約10倍も高いこと見いだされている。²¹⁾ われわれは、酵母の属種によって脂質組成に差

Table 1. 冷凍耐性酵母와 冷凍感受性酵母의 脂質組成

| | 冷凍耐性酵母 D ₂₋₄ | 冷凍感受性酵母 60B3 |
|--------------------------|-------------------------|--------------|
| 總脂質(mg/100 mg タ단백質) | 24.7 | 24.6 |
| 中性脂質(タ)/12.4 | 16.2 | |
| リソ脂質(タ) (P) | 12.3 | 8.4 |
| ステロール(タ) (S) | 1.9 | 2.2 |
| S/P(mole) | 0.3 | 0.5 |
| 인지질組成(%) | | |
| phosphatidic acid | 2.1 | 2.1 |
| cardiolopen | 6.9 | 7.9 |
| phosphatidylserine | 5.2 | 6.3 |
| phosphatidylinositol | 18.8 | 19.2 |
| phosphatidylethanolamine | 37.3 | 34.8 |
| phosphatyl | 29.7 | 29.7 |
| 인지질와 脂肪酸組成(%) | | |
| 14 : 0 | 0.4 | 0.5 |
| 14 : 1 | 0.1 | 0.1 |
| 16 : 0 | 15.4 | 15.8 |
| 16 : 2 | 1.2 | 1.1 |
| 18 : 0 | 1.5 | 1.7 |
| 18 : 1 | 29.2 | 29.2 |
| 18 : 2 | 32.4 | 31.6 |

冷凍耐性率 D₂₋₄ : 79%, 60B 3 : 47%

*10% 설탕을 함유한 합성배지에서서의 가스 발생량을 100으로 해, 2시간 전 반효후, -20℃ 에서 1주간 동결시킨 균체의 잔존 발효력의 비율

지방산 조성을 비교하면, 냉동내성 효모 쪽이 냉동감수성효모 보다도 지방산 함량이 많았으며, 그 차이는 불포화 지방산에 의한 것으로 밝혀졌다. 또, 불포화 지방산 중 리놀산 양에 차이가 있으며, 특히 *S. rosei*의 리놀산 함량이 빵효모의 약 10배 이상 높은 것으로 알려졌다²¹⁾. 저자들은, 효모의 냉동내성과 막지질 조성과의 관련을 명확히 하기 위해, 냉동내성 균주 D₂₋₄과 냉동감수성 주 60B3의 지질 조성을 비교했다. 표 1에 나타난 바와 같이, 양균주의 균체 총지질량에는 거의 차이가 없었으나, 총인지질량은 냉동내성균의 쪽이 감수성균보다 많았으며, 중성지질량은 감수성균쪽이 많다는 것을 밝혔다. 또, 양균주의 인지질 조성 및 구성 지방산의 조성비에는 특히 큰차이는 인정되지 않았다. 양효모의 인지질 구성 지방산의 특징으로, 전지방산에 대한 불포화 지방산이 차지하는 비율이 양쪽다 80%를 넘어, 이것은 동효모의 지질성분의 특성을 나타내는 것으로 생각되어진다. 또, 중성지질 획분 중 sterol 함량은 거의 같은 정도였으나, 인지질에 대한 몰비(S/P)는 냉동감수성균 쪽이 냉동내성 균보다 약 1.6배 높았다. 세포막에 존재하는 sterol 및 인지질은 세포막의 유동성, 그것에 수반되는 물질의 투과성을 조절하는 인자로 중요하며, sterol과 극성인지질과의 상대비는 저온에 있어서 효

表 1 ■ 冷凍耐性酵母と冷凍感受性酵母の脂質組成

| | 冷凍耐性酵母 D2-4 | 冷凍感受性酵母 60B3 |
|----------------------|-------------|--------------|
| 総脂質 (mg/100mg タンパク質) | 24.7 | 24.6 |
| 中性脂質 (N) | 12.4 | 16.2 |
| リン脂質 (L) (P) | 12.3 | 8.4 |
| ステロール (S) | 1.9 | 2.2 |
| S/P (モル比) | 0.3 | 0.5 |
| リン脂質組成 (%) | | |
| ホスファチジン酸 | 2.1 | 2.1 |
| カルジオリピン | 6.9 | 7.9 |
| ホスファチジルセリン | 5.2 | 6.3 |
| ホスファチジルイノシトール | 18.8 | 19.2 |
| ホスファチジリエタノールアミン | 37.3 | 34.8 |
| ホスファチジルコリン | 29.7 | 29.7 |
| リン脂質の脂肪酸組成 (%) | | |
| 14:0 | 0.4 | 0.5 |
| 14:1 | 0.1 | 0.1 |
| 16:0 | 15.4 | 15.8 |
| 16:1 | 19.7 | 20.2 |
| 16:2 | 1.2 | 1.1 |
| 18:0 | 1.5 | 1.7 |
| 18:1 | 29.2 | 29.2 |
| 18:2 | 32.4 | 31.6 |

冷凍耐性率* D2-4: 79%, 60B3: 47%

* 10% シュロ糖を含む合成培地でのガス発生量を 100 とし、2 時間前発酵後、-20°C で 1 週間凍結した菌体の残存発酵力の割合。

異があることから、酵母の冷凍耐性と膜脂質組成との関連を明確にするために、冷凍耐性株 D2-4 と冷凍感受性株 60B3 の脂質組成を比較した。表 1 に示すように、両菌株の菌体総脂質量にはほとんど差異がなかったが、総リン脂質量は冷凍耐性菌の方が感受性菌より多く、中性脂質量は感受性菌の方が多いたことがわかった。また、両菌株のリン脂質組成ならびに構成脂肪酸の組成比には特に大きな差異は認められなかった。両酵母のリン脂質構成脂肪酸の特徴として、全脂肪酸に対する不飽和脂肪酸の占める割合がいずれも 80% を越えており、これは同酵母の脂質成分の特性を示しているものと思われる。また、中性脂質両分のうちステロール含量はほぼ同程度であったが、リン脂質に対するモル比 (S/P) は冷凍感受性菌の方が冷凍耐性菌より約 1.6 倍高くなっている。細胞膜に存在するステロールおよびリン脂質は、細胞膜の流動性、それに伴う物質の透過性を調節する因子として重要であり、ステロールと極性リン脂質との相対比は低温における酵母の膜障害の受けやすさと密接な関連を持っているものと推定される。

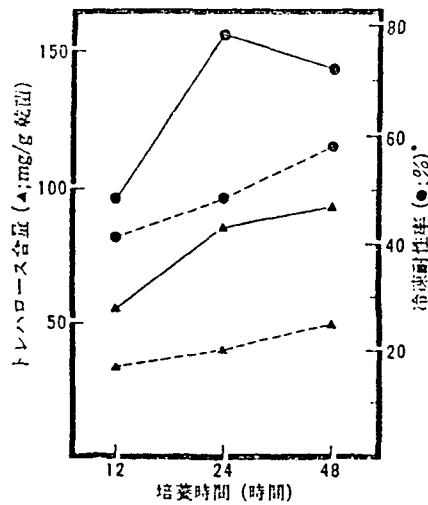


Fig. 6. 효모의 trehalose 함량과 냉동내성.

모의 막장해를 받기 쉬운 것과 밀접한 관계를 갖고 있다고 추정된다.

(4) 세포내 저장물질 trehalose 함량과 냉동내성

Trehalose(α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside)는, 세포내 저장 탄수화물로 세균, 효모, 조류, 곤충, 무척추 동물 등 자연계에 널리 분포되어 있다. 효모의 trehalose는 glycocogen과 함께 주로 energy 원으로, 생리적으로 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되어져 왔으나, 근년에 세포의 동결보호작용이나 건조과정에 있어서 세포막의 보호작용 등 동물의 스트레스 방어 물질로서의 기능을 갖는 당류로, 그 생리작용이 주목되고 있다²²⁾. 빵효모의 냉동내성과 균체내 trehalose 함량의 관련에 대해서는, 냉동생지법에 적합한 *Saccharomyces*속 효모는 보통 빵효모보다 trehalose 함량이 높은 점이나²³⁾, 빵효모의 공업적 배양에 있어서 회분배양법 보다 유가배양법의 쪽이 냉동내성이 우수한 효모를 얻을 수 있다는 점, 보다 호기적인 조건에서 배양한 효모가 높은 냉동내성을 나타내면, 그 trehalose 함량도 많은 것이 보고되어 왔다²⁴⁾. 또 대수기 및 정상기의 균체의 동결저장 후의 생존율은, *S.cerevisiae*에 속하는 냉동내성균과 비교해 *K.thermotolerans* FRI-501이 현저하게 높았으며, 후자가 동결에 의한 장해를 받기 어려운 효모인 것이 밝혀졌다²⁵⁾. 또, 냉동내성효모의 정상기 균체의 trehalose 농도가 냉동감수성균이 0.1% 이하가 되는데 반해, 냉동내성주에서는 1% 이상의 level을 유지하고 있는 등이 발견되었다.

필자들도, 냉동내성주 D₂₋₄과 냉동감수성균 60B3의 trehalose 함량과 냉동내성이 배양시기에 따라 어떻게 변화하는가를 살펴보았다^{18,26)}. 그림 6에 나타난 바와 같이, 냉동내성주는 감수성주보다 균체당 trehalose 함량이 높고, 24시간 배양균체의 trehalose 양은 최대 10%였다. 또 양균주 모두 trehalose 함량과 냉동내성률은 배양시간의 경과와 더불어 증대하여, 이 결과로부터도 효모의 trehalose 양과 냉동내성과의 사이에 긴밀한 관계가 있음이 추정되었다. 세포내 trehalose 생합성은, trehalose 합성효소 및 분해효소계에 의해 조절되고 있으나, 효모의 증식이 왕성한 대수기보다 정상기에 있어

(4) 細胞内貯蔵物質トレハロース含量と冷凍耐性

トレハロース (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) は、細胞内貯蔵炭水化物として細菌、酵母、藻類、昆虫、無脊椎動物など自然界に広く分布している。酵母のトレハロースは、グリコーゲンとともに主としてエネルギー源として生理的に重要な役割をもつと考えられていたが、近年になって細胞の凍結保護作用や乾燥過程における細胞膜の保護作用など細胞のストレス防御物質としての機能をもつ糖類として、その生理作用が注目されている。²²⁾ パン酵母の冷凍耐性と菌体内トレハロース含量との関連については、冷凍生地法に適した *Saccharomyces* 属酵母は普通パン酵母よりもトレハロース含量が高いことや²³⁾、パン酵母の工業的培養において流加培養法の方が回分培養法より冷凍耐性に優れた酵母を取得できること、より好気的な条件で培養した酵母が高い冷凍耐性を示し、そのトレハロース含量も多いことなどが報告されている。²⁴⁾ また、対数期および定常期の菌体の凍結貯蔵後の生存率は、*S. cerevisiae* に属する冷凍耐性菌に比べ *K. thermotolerans* F R I - 5 0 1 が著しく高く、後者が凍結による障害を受けにくい酵母であることが明らかにされている。²⁵⁾ また、冷凍耐性酵母の定常期菌体のトレハロース含量が高いこと、発酵に伴って菌体内トレハロース濃度が冷凍感受性株で 0.1% 以下になるのに対して、冷凍耐性株では 1% 以上のレベルを維持していること等が見いだされている。

筆者らも、冷凍耐性菌 D 2 - 4 と冷凍感受性菌 6 0 B 3 のトレハロース含量と冷凍耐性が培養時期によってどのように変化するかを調べた。^{18, 26)} 図 6 に示したように、冷凍耐性株は感受性株よりも菌体当りのトレハロース含量が高く、24 時間培養菌体のトレハロース量は最大 1.0% であった。また、両菌株ともトレハロース含量と冷凍耐性率は培養時間の経過とともに増大しており、この結果からも酵母のトレハロース量と冷凍耐性との間に密接な関連があることが推定される。細胞内トレハロースの生合成は、トレハロース合成酵素および分解酵素系によって調節されているが、酵母の増殖が盛んな対数期よりも定常期において著しい蓄積が起こるのは、生育環境の悪化にともなう細胞のストレス防御因子としてトレハロースの生合成が活発になるためであろう。酵母のトレハロース代謝活性と冷凍耐性機構との関連を研究することも今後の興味ある課題の一つであろう。

おわりに

酵母の冷凍耐性あるいは冷凍感受性は細胞のどのような遺伝学的特性に基づいて発現されるのであろうか。遺伝子工学的手法によって酵母の冷凍耐性因子を明らかにすることは

현저한 축적이 일어나는 것은, 생육환경의 악화에 수반되는 세포의 stress 방어인자로 trehalose의 생합성이 활발히 되기 때문이다. 효모의 trehalose 대사 활성화와 냉동내성 기구와의 관련을 연구하는 것도 급후, 흥미있는 과제의 하나이다.

III. 결 론

효모의 냉동내성 또는 냉동감수성은 세포의 어떠한 유전학적 특성에 기초를 두고 발현되는 것일까? 유전자 공학적 수법에 의해 효모의 냉동내성 인자를 밝히는 것은 급후의 흥미있는 연구과제이다. 효모라는 친숙한 소재를 사용하여, 복잡한 냉동내성 기구를 밝힐 수 있다면 응용적으로 보다 우수한 냉동내성 효모를 개발하는 것도 가능할 것이다. 또, 효모의 냉동내성 기구의 연구는, 저온환경에 있어서 미생물이나 동식물의 생명현상의 조절기구를 해명하는데 중요한 지견을 줄 것으로 기대된다.

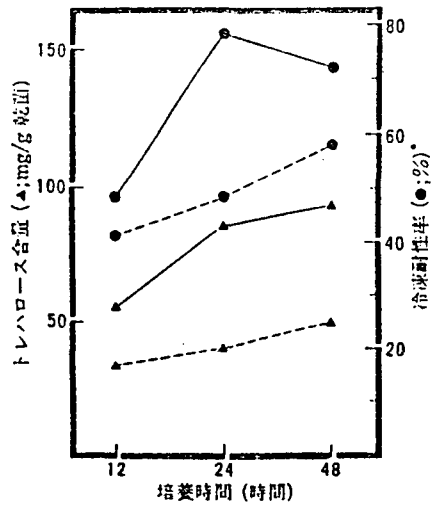


図 6 ■ 酵母のトレハロース含量と冷凍耐性
 ——: 冷凍耐性菌 D2-4, ----: 冷凍感受性菌 60B3.
 * 表 1 の注参照

今後の興味ある研究課題である。酵母という身近な素材を用いて、複雑な冷凍耐性機構を明らかにすることができれば、応用的により優れた冷凍耐性酵母を開発することも可能となるであろう。また、酵母の冷凍耐性機構の研究は、低温環境における微生物や動植物の生命現象の調節機構を解明する上で貴重な知見を与えてくれるものと期待される。

文献

- 1) 田中康夫: 食の科学, 7, 2, 54 (1983).
- 2) 田中康夫: 日食工誌, 2, 8, 100 (1982).
- 3) 田中康夫: 日本コールドチェーン研究会誌, 1, 0, 2 (1984).
- 4) T. Nei, T. Araki, and T. Matusaka: "Cellular Injury and Resistance to Freezing Organisms", Sapporo Inst. Low Temp. Sci., 1963, p. 139.
- 5) 田中康夫, 中江利明: "冷凍生地の理論と実際", 食研センター, 1982, p19.
- 6) 田中康夫: 食糧—その科学と技術—, 食総研, 第19号, 1977, p. 45.
- 7) 田中康夫, 高野博幸, 伊藤寛: 特願昭57-40044, 特許1290653
(昭和60年11月)
- 8) A. Hino, H. Takano and Y. Tanaka: Cereal Chem., 6, 4, 269 (1987).
- 9) 田中篤治, 深津 , 菅浦敏夫, 榎田静雄, 寺本進, 小玉健太郎, 古谷航平, 内藤敦

- : 日食工誌, 23, 661 (1984).
- 10) Y. Hahn and H. Kawai: J. Home Econ. Jpn., 41, 115 (1990).
- 11) Y. Hahn and H. Kawai: Agric. Biol. Chem., 54, 829 (1990).
- 12) P. Mazur: "Cryobiology", Academic Press, 1966, p. 213.
- 13) T. Nei: "Culture Collections; Perspectives and Problems", Toronto Univ., Toronto Press, 1963, p. 74.
- 14) A. H. Rose: "Biology and Activity of Yeast", Academic Press, 1980, p. 103.
- 15) 高野博幸: 昭和63年度農林水産業研究成果発表会資料集, p. 50, 1989
- 16) 佐藤友太郎, 田中康夫: イースト技報, 22, 47 (1961).
- 17) T. Okada and H. Yoshizumi: Agric. Biol. Chem., 37, 2289 (1973).
- 18) Y. Murakami, Young-Sook Hahn, K. Yokoigawa, K. Endo and H. Kawai: Biosci. Biotech. Biochem., 58, 206 (1994).
- 19) 田中康夫, 工藤範子, 小柳妙, 佐藤友太郎: イースト技報, 42, 27 (1972).
- 20) 鬼頭誠: 化学と生物, 12, 220 (1974).
- 21) 田中康夫, 嶋田昇二, 斉藤拓: "酵母の増殖と利用", 学会出版センター, 1985, p. 211.
- 22) J. H. Crowe, L. M. Carpenter, J. F. Carpenter, and Aurell-Wistrom: Biochem. J., 242, 1 (1987).
- 23) Y. Oda, K. Uno and S. Ohta: Appl. Environ. Microbiol., 52, 941 (1986).
- 24) P. Gelinas, G. Fiset, A. LeDuy and J. Goulet: Appl. Environ. Microbiol., 55, 2453 (1989).
- 25) A. Hino, K. Mihara, K. Nakashima and H. Takno: Appl. Environ. Microbiol., 56, 67 (1990).
- 26) 河合弘康, 化学と生物, 31, 374 (1993).