

大豆ペプチドの利用による食品有用微生物の品質改善と その分子機構の解析

井沢真吾*

京都大学大学院農学研究科

Quality Improvement of Microorganisms by Soy Peptides

Shingo IZAWA

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

The physiological functionality of soy peptides in mammal has been well investigated. It has been reported that soy peptides show various potencies such as scavenging oxidative stress, reducing serum lipid levels, and anti-fatigue effects in mammalian cells. Therefore, soy peptides have been attracting worldwide attention as functional food ingredients. In contrast to the recent progress in the study on mammalian physiology, effects of soy peptides on industrial microorganisms remain to be solved. To promote more effective use of soy peptides in different ways, we examined their validity as ingredients of culture media to improve the quality of food microorganisms. In this study, we show that the cultivation of yeast cells in media containing soy peptides can improve tolerance to freeze-thaw stress, indicating that soy peptides are suitable ingredients of culture media to provide high-quality yeast cells for frozen-dough technology. The baked bread using yeast cells cultured with soy peptides was of better quality in terms of texture and volume than the bread using cells with casein peptone. We further investigated the mechanisms of the improved tolerance to freeze-thaw stress by soy peptides. Compared with yeast cells cultured with casein peptone, cells cultured with soy peptides showed higher levels of intracellular proline, valine, and aspartic acid. Contrary, the cultivation with soy peptides resulted in decreased levels of intracellular alanine and arginine. Additionally, yeast cells cultured with soy peptides showed the decreased number and size of lipid particles. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 61-66, 2008.

Key words : soy peptides, baker's yeast, freeze-thaw stress, frozen-dough technology, lipid particle

*〒611-0011 宇治市五ヶ庄

大豆ペプチドによる生活習慣病の予防や抗疲労効果、活性酸素種の除去や中性脂肪レベルの低減など、ヒトの健康改善を目的とした哺乳動物での研究は目覚ましい進展を遂げてきた。しかし、哺乳動物以外の生物に対する大豆ペプチドの有効利用に関しては非常に限られた報告しかないのが現状である。本研究では、発酵食品の製造に利用される食品有用微生物の品質や培養効率が、大豆ペプチドによって改善されるのか検証し、大豆ペプチドの新たな利用法を模索した。本稿では大豆ペプチドによるパン酵母の冷凍耐性改善について報告する。

近年、焼き立てのフレッシュなパン製品に対するニーズの高まりや、製パン作業の効率化を求める声に応じて、製パン業界では成型冷凍生地から焼成する方法、冷凍パン生地製法（frozen-dough technology）の導入が進んでいる。しかし、冷凍保存による酵母の死滅や発酵力の低下に起因するボリュームの低下およびフレーバーの変化が問題になっており、冷解凍ストレスに強いパン酵母の開発が求められている。これまでに、冷凍耐性に寄与する細胞内クリオプロテクタントとして、トレハロースやグリセロール、プロリンなどの関与が報告されている。また、遺伝子工学的な手法によりこれらの細胞内レベルを上昇させ、冷凍耐性を上昇させる取り組みについても複数の研究報告が出されている。しかし消費者の抵抗感が依然として高いことから、遺伝子組み換え技術を用いずに、大豆ペプチドを用いた培養によって酵母の冷凍耐性を向上させる方法を本研究では検討した。

方 法

菌体および培地

業務用パン酵母株としてオリエンタル酵母株式会社製レギュラー株、および実験室酵母株として *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A株を用いた。また、大豆ペプチド（SP）培地、Bacto peptone（BP）培地、およびCasein peptone（CP）培地として1.0~3.0% w/vの各ペプチドおよびpeptoneと2%グルコースを含む培地（pH 5.5）を調製した。また、実験室条件での標準的な培地であるYeast nitrogen base（YNB）培地（2%グルコース、0.67% YNB w/o amino acid、pH 5.5）は適宜アミノ酸や核酸を添加して使用した。SPとして不二製油社製Hinute-Rを、BPとCPはそれぞれBecton Dickinson社とナカライテスク社より購入した。菌体は28℃、120 rpmの震盪培養で定常期まで培養した。

冷凍耐性と発酵能の測定

酵母の冷凍耐性の測定は定法に従った¹⁾。冷凍パン生地の調製はMurakamiらの方法に従い²⁾、70 gごとに丸めたパン生地を-30℃で7日間冷凍貯蔵した。解凍および発酵は37℃で行い、パンの焼成は-220℃で20分間行った。細胞内グリセロールおよびトレハロースの測定はそれぞれF-kit Glycerin（Roche Diagnostics製）とK-TREH（Megazyme International Ireland製）を用いた。細胞内アミノ酸はアミノ酸分析計L-8500A（Hitachi製）を用いて測定した。

Lipid particleの観察

Lipid particle膜上に局在するErg6-GFPおよびNile Red染色を蛍光顕微鏡（Olympus, BX51 system）で観察・解析した。

結果と考察

大豆ペプチドによる酵母細胞の生育促進効果

まず培地成分として利用した際の、酵母細胞の生育に対する効果を検討した。

Fig. 1は、各培地で80時間培養した際の菌体収量を表しているが、SP培地で培養した際の回収された菌体量は、YNB培地の約5倍、CP培地やBP培地と比べても約2.5倍と非常に多く、培養効率が非常に高いことが明らかとなった。

また、SP培地中のSP濃度の影響を検討したところ、2.5%前後の大豆ペプチドを含む培地で、最も多くの菌体が回収され、酵母の培養に必要な充分な窒素源が2.5%前後の大豆ペプチドで供給できると判断された（Fig. 1）。これらの結果から、大豆ペプチドは、菌体収量を大幅に改善し、効率的な酵母細胞の培養を可能にする、優れた培地成分であると考えられた。

酵母冷凍耐性の改善

次に、大豆ペプチド培地で培養した細胞の冷凍ストレス耐性について検討を行った。各種培地で培養した細胞を、-30℃で7日間冷凍保存した後の生存率を検討したところ、大豆ペプチド培地で培養した細胞は、70%前後の細胞が生き残っており、他の培地で培養した細胞に比べ高い生存率を維持した（Fig. 2）。このことは、大豆ペプチド培地によって効率的にパン酵母を培養できるのみならず、冷凍パン生地製法に適した高い冷凍耐性を持つ酵母を調製できる可能性を示唆する結果であった。

食パン製造に及ぼす影響

そこで、パン生地として冷凍保存した場合の効果について検討を行った。強力粉200 gに対し砂糖10 g、塩

4 g, 酵母5 g, 水124 ccを加え, 捏ね機でパン生地を調製した. 冷凍前は, いずれの培地で培養した酵母細胞も, Fig. 3のように同様の良好な発酵力を示した.

しかし, 一週間-30℃で冷凍したパン生地は, 培地によって, 冷凍解凍後の残存発酵力には大きな違いが観察された. YNB培地やCP培地で培養した酵母を用いたパン生地では十分な膨張が観察されないのに対し, SP培地で培養した細胞を用いたパン生地は良好な発酵を示し, 冷凍しなかったパン生地とほぼ遜色のないレベルまで膨張した (Fig. 3). SP培地で培養した細胞が高い冷凍耐性を持つことを考慮すると, 他の培地で

培養した場合と比べ, SP培地由来の酵母細胞はパン生地中でもより多くの細胞が生き残っているため, 高い発酵力が残ったのではないかと推測される. つまり, 各種培地で培養した細胞の冷凍耐性の違いを反映して, 解凍後のパン生地の膨らみ具合に差が出たのではないかと考えられた.

また, 実際にパンを焼成したところ, 生地が十分に膨張しなかったCP培地由来の細胞を使ったパンは, ガスによる気泡の形成も不十分だったため, 大変固く, 食感も重いパンしか製造されなかった. 一方, SP培地で培養した細胞を使ったパンは, 冷凍しないで焼成した場合とほぼ同様の良好な外観や食感, 風味を呈した (Fig. 4). 以上の結果から, 大豆ペプチドを培地成分として利用しパン酵母を培養することは, 冷凍パン生地製法におけるパン酵母の冷凍耐性を改善する上で非常に有効であると考えられた³⁾.

冷凍耐性改善機構の解析

それでは, なぜ大豆ペプチドで培養すると冷凍耐性が改善されるのか? その理由の検討を行った. これまでに, 細胞内のトレハロースやグリセロール, アミノ酸レベルが酵母の冷凍耐性に影響を及ぼすことが報告されている. そこで, これらの細胞内レベルを測定し

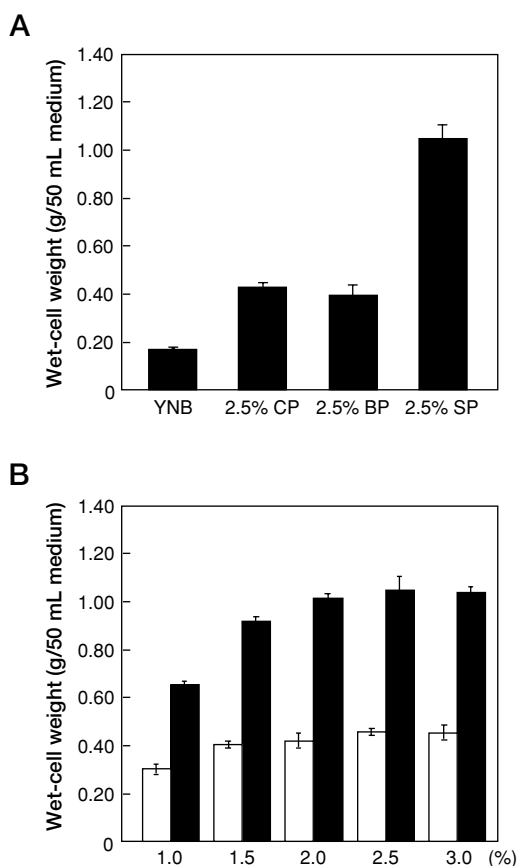


Fig. 1. Wet weight of yeast cells cultured for 80 h. (A) Yeast cells cultured in 800 mL of each medium for 80 h with shaking (120 rpm) at 28℃ were collected, washed with distilled water, and weighed. Results are expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. (B) Dose-dependent effects (1.0-3.0%) of soy peptides or casein peptone on the proliferation of baker's yeast cells were monitored. Black bars, SP media; white bars, CP media.

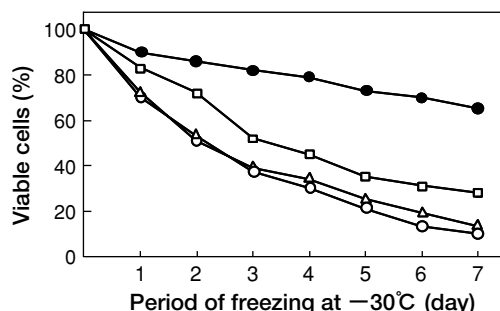


Fig. 2. Soy peptides improve tolerance to freeze-thaw stress. Resistance to freeze-thaw stress was determined by measuring the viability of frozen-thawed cells. Approximately 2×10^6 cells ($100 \mu\text{L}$ of cell suspension per 1.5 mL tube) were frozen and kept at -30°C for 7 days. Frozen cells were thawed and plated on YPD agar plates (2% glucose, 2% pepton, 1% yeast extract, and 2% agar, pH 5.5) after dilution with a 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). Percent survival was expressed relative to the initial viability prior to freezing. Cells were grown in each medium. Closed circle, SP medium; open square, CP medium; open triangle, BP medium; open circle, YNB medium.

たところ、トレハロースやグリセロールについては、培地成分の違いによる影響というのはほとんど観察されなかった。しかし、各種のアミノ酸レベルについては有意な違いが観察され、とくに冷凍耐性を賦与すると報告されているプロリンの細胞内レベルが他の培地での培養に比べ約3～4倍上昇することが判明した (Fig. 5)。そのため、大豆ペプチド培地での培養によって酵母細胞が高い冷凍耐性を示したのは、細胞内プロリンレベルの上昇が一因ではないかと考えられた。

また、細胞内脂質代謝においてもSP培地特有の効果が確認された。トリアシルグリセロール (TAG) およびステリルエステル (SE) の細胞内貯蔵オルガネ

ラであるlipid particle (LP) を顕微鏡観察したところ、SP培地以外の各種培地を用いて培養した細胞では、定常期にLPの数およびサイズの増加が観察されるのに対し、SP培地で培養した細胞はLPの形成がほとんど観察されなかった (Fig. 6)。また、薄層クロマトグラフィーによる解析では、SP培地で培養した細胞の細胞内TAGレベルの顕著な低下が確認された。現時点では、SP培地を用いた培養による脂質代謝の変化が生体膜脂質組成にも影響を与え、膜の流動性や透過性の変化を介して酵母細胞の冷凍耐性を改善したのではないかと推測している。

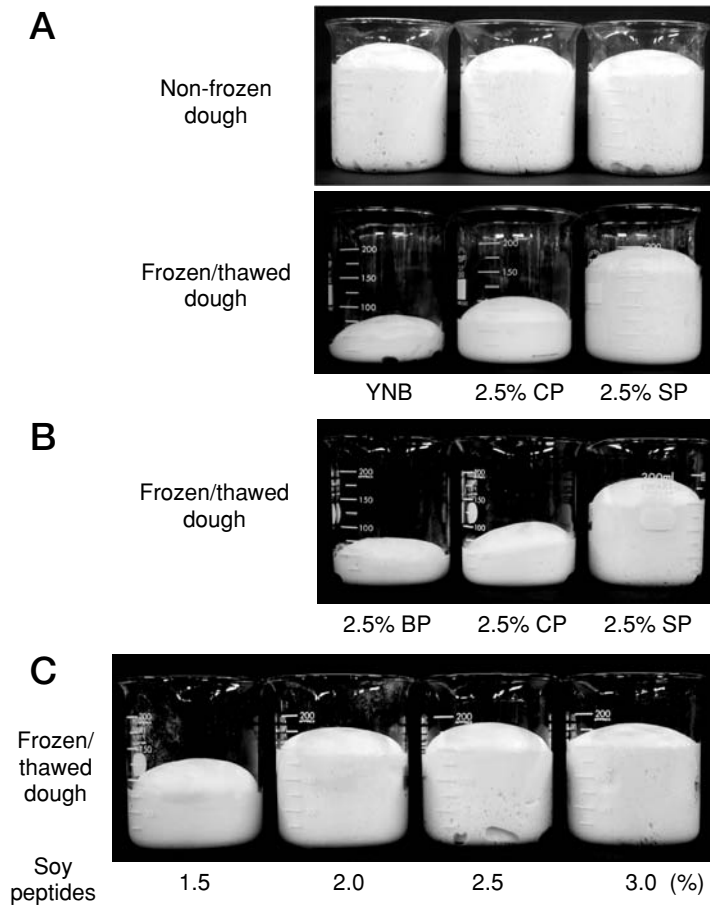


Fig. 3. Soy peptides affect the gassing power remaining in frozen-thawed dough. White bread dough (70 g) was prepared using various yeast cells and frozen at -30°C . After being stored frozen for 7 days, the dough was thawed and incubated at 37°C for 3 h. (A) The gassing power remaining in frozen-thawed dough was observed and compared with that of non-frozen samples. Non-frozen dough was incubated at 37°C for 1 h. (B) Effect of BP medium on the gassing power remaining in frozen-thawed dough was compared with those of CP and SP media. (C) Effects of the concentration of soy peptides in the medium on the gassing power remaining were monitored.

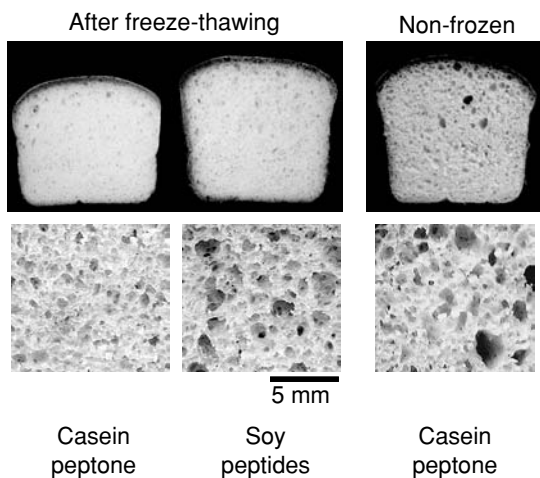


Fig. 4. Effect of soy peptides on the final bread quality. White bread dough was prepared using cells cultured in 2.5% CP medium or 2.5% SP medium and frozen at -30°C for 7 days. After incubation at 37°C for 3 h, the frozen-thawed dough was baked at 220°C for 20 min and the cut surfaces of bread were compared.

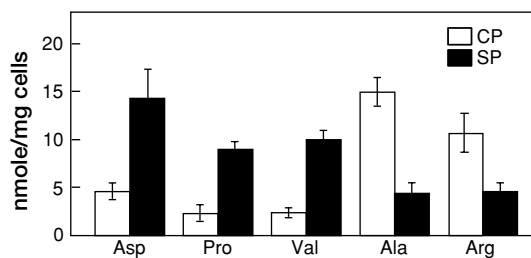


Fig. 5. The level of intracellular proline was higher in SP cells than in CP cells. Since proline is well known as a natural cryoprotectant in yeast cells, the increased level of intracellular proline would partly contribute to the high tolerance of SP cells to freeze-thaw stress.

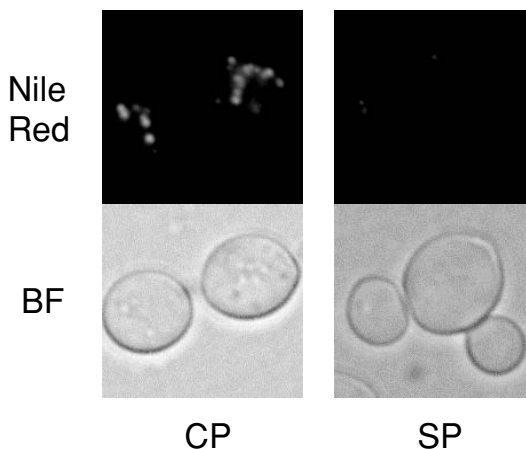


Fig. 6. Cells in stationary growth phase were stained with Nile Red to observe intracellular lipid particles. The size and number of lipid particles in SP cells were apparently smaller than those in CP cells.

要 約

ヒトをはじめとする哺乳動物に対する健康増進機能だけでなく、パン酵母をはじめとする産業用微生物の培養効率改善や品質改良にも大豆ペプチドが有効であることを示した。酵母のストレス耐性についても、冷凍耐性だけでなく高圧ストレス耐性⁴⁾やビール醸造効率の改善効果⁵⁾も報告されている。また、本稿では記さなかったが、酵母以外にも麹菌や酢酸菌といった食品有用微生物に対する機能改良効果についても確認しており、微生物用培地成分として大豆ペプチドの利用は有効だと考えている。微生物に限らず、ヒト以外の生物種に対する機能性の更なる解析によっても大豆ペプチドに秘められた可能性を明らかにすることができると考え、現在詳細な分子機構の解析を継続している。

文 献

- 1) Izawa S, Sato M, Yokoigawa K and Inoue Y (2004): Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, **66**, 108-114.
- 2) Murakami Y, Yokoigawa K, Kawai F and Kawai H (1996): Lipid composition of commercial baker's yeast having different freeze-tolerance in frozen dough. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 1874-1876.
- 3) Izawa S, Ikeda K, Takahashi N and Inoue Y (2007): Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, **75**, 533-538.
- 4) 杉山将宏, 北川さゆり, 佐々木将彦, 阿部文快 (2008): 高圧・低温ストレス下での酵母増殖における大豆ペプチドの有効性. 日本農芸化学会 2008年度大会講演要旨集, pp. 84.
- 5) Kitagawa S, Mukai N, Furukawa Y, Adachi K, Mizuno A and Iefuji H (2008): Effect of soy peptide on brewing beer. *J Biosci Bioeng*, **105**, 360-366.