

# パンづくりを支える微生物機能 — 酵母と乳酸菌を中心にして —

島 純<sup>1\*</sup>・小松崎典子<sup>2</sup>・吉田 綾子<sup>3</sup>・安藤 聡<sup>4</sup>・中村 敏英<sup>5</sup>

小麦粉と酵母の絶妙な出会いが、パンという食品に発展し、我々の食卓を美味しく、そして豊かにしてくれている。すなわち、小麦粉のミキシングにより生じるグルテン骨格が酵母の発生する炭酸ガスにより膨化して、ふんわりとした食感を生む。現在では、我が国においてもきわめて重要な食品の一つとなり、米飯について主要な主食の位置を占めている。我が国では、高シヨ糖耐性パン酵母や冷凍耐性パン酵母などの開発に相まってさまざまな種類のパンが製造されている<sup>1)</sup>。パンに関する長い歴史を持つ欧米よりも多品種のパンが我が国の市場に出回っているときえ考えられている。

## 発酵パンの誕生は？

発酵パンの原点は古代エジプト時代とも考えられている。小麦粉からなる生地に、偶然、酵母が自然界から飛び込んだ可能性が想定できる。筆者らは、京都大学農学研究科附属農場の協力を得て、無糖生地(シヨ糖無添加)、サワー生地(乳酸添加)、高糖生地(30%シヨ糖含有)をワンセットにして、京都農場のブドウハウスや花卉ハウスなどの約10か所に設置して、生地の様子を観察するとともに、生地からの酵母の単離を試みた(図1)。生地の乾燥を霧吹きで補いながらの予備的な検討ではあったが、生地の膨張は観察されず、パン酵母の単離にも至らなかった。これらの結果は、糖類を豊富に含む果汁からのワインなどの発酵による酵母の集積が発酵パンの誕



図1. 京都農場のブドウの樹下に設置したパン酵母のトラップ

生の背景として必要だったのではないかと、という印象を筆者らに想起させた。今後、さまざまな分野の研究者の活動により発酵パンの起源に関する知見がさらに蓄積されることを期待している。

## 複合発酵系としてみたパンの発酵

パン酵母の工業的生産が開始される以前は、果実や穀物を用いて酵母や乳酸菌を集積した発酵種あるいはビールの発酵残渣が製パンに使用されてきた。微生物が知られていない時代であり、優良な特性を有する発酵種はきわめて貴重であったことが容易に想像可能である。

また、現在でも、世界各地において、酵母と乳酸菌の共発酵によるサワーブレッドが製造されている。サワーブレッド製造に用いられるスターターはサワー種と呼ばれる。代表的なサワーブレッドとしては、北米のサンフランシスコサワー、欧州のパネトーネやライサワーブレッドなどがあげられる。その他、オセアニア、アフリカおよび中国に由来する発酵種も知られている。

一般に乳酸菌は高いプロテアーゼ活性を有しているため、サワーブレッドにおいては、ペプチドやアミノ酸が富化されていることが想定された。また、生産されるペプチドやアミノ酸が機能性を有している可能性も考えられたため、筆者らはサワーブレッドをモデル系としてペプチドおよびアミノ酸の解析を行った。

## サワー生地に見出される機能性ペプチド<sup>2)</sup>

まず、サワー種とパン酵母の両者を含むパン生地およびパン酵母のみを含むパン生地から抽出したペプチド画分の逆相高速液体クロマトグラムの比較検討を行った。その結果、ピークに差異がみられたため、主要なサワー種特異的なピークの精製を行い、質量分析により構造解析を行った(図2)。その結果、特異的なピークは、Val-Pro-Phe-Gly-Val-Glyの6アミノ酸からなるペプチドであることが明らかとなり、SDP1 (Sour Dough Peptide)と名づけた。配列情報を用いた検索により、SDP1は小麦低分子量グルテニンに由来することが示唆された。また、SDP1の生成に関与するプロテアーゼについて解析を行ったところ、乳酸菌の生産する乳酸により酸性条件

\* 著者紹介 <sup>1</sup> 京都大学微生物科学寄附研究部門(特定教授) E-mail: shimaj@kais.kyoto-u.ac.jp

<sup>2</sup> 聖徳大学人間栄養学部, <sup>3</sup> 農研機構畜産草地研究所, <sup>4</sup> 農研機構野菜茶業研究所, <sup>5</sup> 農研機構食品総合研究所

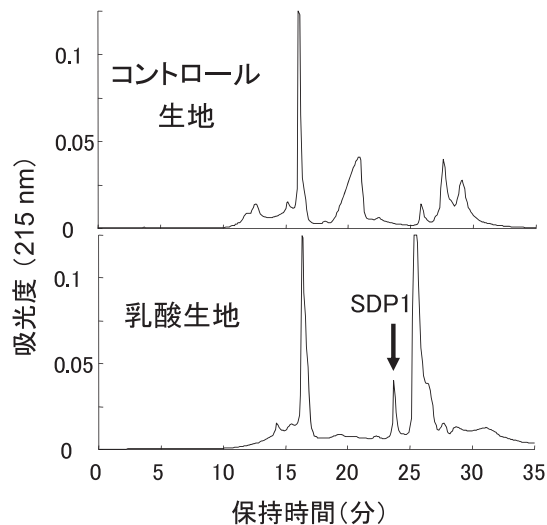


図2. サワー生地から抽出したペプチド画分の高速度液体クロマトグラム

となることで小麦由来の酸性プロテアーゼが活性化し、SDP1を生成していることが示された。

SDP1は、動物の血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin-Converting Enzyme) の活性を阻害するペプチド (ACE阻害ペプチド) と部分的に類似していることを見いだした。そこで、SDP1を化学的に合成した後、ACE阻害活性を評価した。その結果、 $IC_{50}$  は  $336 \mu\text{M}$  と既存のものに比べ低い活性であったが、SDP1はサワー生地に含まれるACE阻害剤の一部として機能している可能性が示唆された。サワーブレッドにはSDP1ばかりでなく、さまざまなペプチドが含まれることが想定されることから、今後、メタボロミクスなどを用いた網羅的な代謝物解析が必要であろう。

### サワー生地中のアミノ酸レベル

ペプチドに加えて、乳酸菌の働きにより遊離アミノ酸が増加している可能性があると考えられるが、サワー生地では遊離アミノ酸は減少するとの報告がある。そこで、サワー種を含む生地発酵を行った後、凍結乾燥および75%エタノールを用いた抽出を行い、アミノ酸アナライザーにより解析した結果、パン酵母を共存させた場合、全遊離アミノ酸のレベルはやはり低下していた。この現象は、サワー種に含まれる酵母や乳酸菌により資化されている可能性が高いと考えられた。興味深いことに遊離アミノ酸が減少しているにもかかわらず、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の量はわずかながら増えていることが明らかとなった。この結果は、潜在的に、サワー生地ではGABAを高生産する微生物叢が含まれていることを意味しているのではないかと考えた。そこで、サワー種から酵母および乳酸菌を単離し、純化した微生物を用いた

サワー生地発酵を行い、GABAの生産量を評価した。その結果、単離された乳酸菌を用いて発酵を行った場合に、GABA蓄積が観察された。これらの結果から、サワー生地に含まれる乳酸菌のGABA生産能により、サワー生地ではGABA量が著しく低下せずに維持されるのではないかと考えられた。GABAは抑制性の神経伝達物質として知られているが、血圧を低下させる作用も報告されている。ACE阻害ペプチドとGABAを含むサワーブレッドは高血圧予防に役立つ可能性がある。

### 機能性アミノ酸高生産乳酸菌の利用<sup>3-5)</sup>

乳酸菌などの微生物によるGABAの生産はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) の機能によると考えられる。そこで、農研機構食品総合研究所の微生物バンクに保存されている食経験を有する乳酸菌株を対象にして、グルタミン酸からGABAを高生産する乳酸菌株の検索を行った。その結果、我が国の伝統発酵食品である鮎寿司から分離された乳酸菌NFRI 7415株がGABAの高生産能を有していることを見いだした。本乳酸菌株を16S rDNAの塩基配列などから同定したところ、*Lactobacillus paracasei*に属する菌株であることが示された。

*Lb. paracasei*のGADに関してはいまだ報告がないため、NFRI 7415株からGADを生化学的に精製し、諸性質を検討した。イオン交換クロマトグラフィーなどにより精製を行ったところ、SDS-PAGEにおいて単一のバンドとして観察された。また、本酵素はSDS-PAGEにおいて分子量57,000、ゲルろ過において分子量110,000を示し、2量体を形成していることが示唆された。本酵素と他の乳酸菌の酵素学的性質の比較を表1に示した。本酵素の至適温度は $50^{\circ}\text{C}$ であり、他の乳酸菌由来のGADと比較して著しく高いことが明らかになった。この性質は、発酵食品製造への応用に加えて、酵素の工業利用にも有用な性質であると考えられた。さらに、精製酵素の部分アミノ酸配列を決定した。アミノ酸配列情報

表1. *Lb. paracasei*, *Lactobacillus brevis* および *Lactococcus lactis* のGADの性質

	<i>Lb. paracasei</i> NFRI 7415	<i>Lb. brevis</i>	<i>L. lactis</i>
分子量 (SDS-PAGE)	57,000	60,000	54,000
分子量 (ゲルろ過)	110,000	120,000	
$K_m$ 値	5.0 mM	9.3 mM	0.5 mM
至適pH	5.0	4.2	4.7
至適温度	$50^{\circ}\text{C}$	$30^{\circ}\text{C}$	

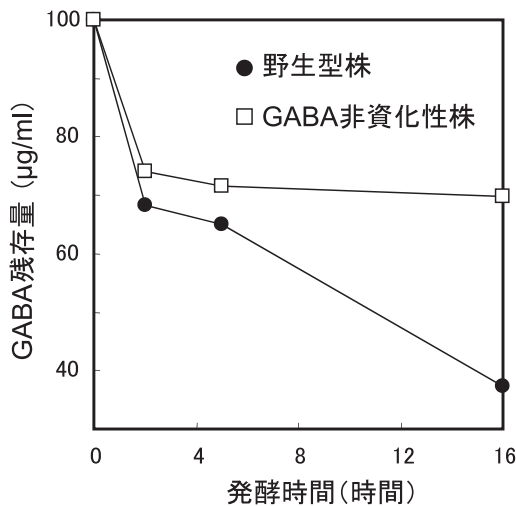


図3. GABA非資化性酵母を用いた発酵プロセスにおけるGABA量の変化

を基にPCR用のオリゴヌクレオチドを設計し、GADをコードする遺伝子のクローン化にも成功している。

また、NFRI 7415株の機能評価の一環として、ラットを用いてプロバイオティクス機能を評価した<sup>5)</sup>。エタノールの慢性摂取に対する効果を調べたところ、総コレステロールの低減に機能する可能性が示された。本株のGABA生産能との関連は现阶段でははっきりしていないが、今後も機能解析を続けたいと考えている。

一方、*Lb. paracasei* NFRI 7415株を用いたサワー生地を調製した場合にも、パン酵母によるGABAの資化により顕著なGABAレベルの増加は観察されなかった。

#### 複合系を前提としたパン酵母の育種<sup>6)</sup>

前述のように、GABA生産能を有する乳酸菌を用いた場合でも、パン酵母が共存した場合には、サワー生地中のGABAの増強は限定的である。そこで、GABAの資化性を抑制したパン酵母を用いることにより、GABAの増加が促進できるのではないかと考えた。

実用パン酵母系統の2倍体株に紫外線を照射して変異を誘発した。GABA含有培地におけるナイスタチン選択によりGABA資化性株を取り除いたうえで、GABA非資化性株の選抜を行った。その結果、GABA含有培地において生育できない変異株が取得された。さらに、遺伝学的手法を用いて変異の原因遺伝子の特定を行った。その結果、窒素源代謝促進に関与する転写因子*DAL81*に変異が生じていることが示された。また、得られたGABA資化性パン酵母の生育特性およびパン生地での発酵特性は野生型株とほぼ同等であることも確認できた。

そこで、GABA生産性乳酸菌およびGABA非資化性

パン酵母の組み合わせによる液体発酵試験を行った。その結果、非GABA資化性パン酵母を用いることにより、GABA含有量を高レベルで維持させることが可能になった(図3)。以上、GABAおよび複合微生物系として捉えられるサワー生地をモデルとした研究について述べた。複合微生物系においても、各要素となる微生物を一定の方向性をもって育種することにより、相乗的な効果が得られる可能性があると考えている。

#### まとめに代えて

製パン用酵母の工業的な生産が実用化されたことにより、パン酵母を中心とした比較的単純な微生物叢からなるパンの大量製造が可能になった。また、一方で、乳酸菌の生産するプロテアーゼなどにより、遊離アミノ酸や低分子量ペプチドが増加し、風味や機能性に優れたパンが製造できる可能性も考えられる。このような背景から、乳酸菌を含む発酵種や発酵風味液を用いた個性的な製パン技術への関心も高まってきている。

また、複合微生物系としてパンを捉えた場合には、さまざまな発酵微生物の育種の方向性が想定できる。その際に、本稿で述べた研究がモデルになればと考えている。一方、自然環境や動物内環境における複合微生物系と同様に、発酵食品環境における微生物相互作用に関する研究蓄積はきわめて十分とは言えず、次世代シーケンサーなどの解析機器により研究が飛躍的に進捗することが期待される。

本稿では、おもに酵母と乳酸菌との関連から述べたが、我が国では、麹菌を含む酒種を用いた製パンも行われてきた歴史をも有している。我が国の優れた発酵技術の活用により我々の食卓がより豊かになっていくことを望んでいる。

本研究の一部は、公益財団法人発酵研究所の寄附講座助成の支援により行った。京都農場への酵母トラップの設置にあたっては、京都大学農学研究科附属農場および米森敬三教授、縄田栄治教授、土井元章教授、樋口浩和准教授のご協力を得た。また、実験の一部について、田中晃一准教授および吉山洋子博士のご支援を得た。

#### 文 献

- 1) Shima, J. and Takagi, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 155 (2009).
- 2) Nakamura, T. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4871 (2007).
- 3) Komatsuzaki, N. et al.: *Food Microbiol.*, **22**, 497 (2005).
- 4) Komatsuzaki, N. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 278 (2008).
- 5) Komatsuzaki, N. and Shima, J.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 232 (2012).
- 6) 安藤 聡ら：日本食品科学工学会誌, **55**, 32 (2008).