

大豆ペプチドの新規機能性と 食品微生物機能改良への利用

井 沢 真 吾 
(京都工芸繊維大学・応用生物)

大豆ペプチドによる

- 冷凍パン生地製法におけるパン酵母冷凍耐性の改良
- 細胞内リピッドボディ形成の抑制
- 遺伝子発現への影響(マイクロアレイ解析)



大豆ペプチドによる酵母冷凍耐性の改善と 冷凍パン生地製法への利用

Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides



背景



パン職人の負担軽減やオンデマンド販売のために
冷凍パン生地製法が普及

↓
冷凍パン生地製法による製パン過程では、
冷解凍による酵母の死滅・発酵力の低下が
パンの品質を大きく左右

↓
酵母の冷凍耐性の向上が求められている



酵母冷凍耐性に寄与する因子

トレハロース
グリセロール
各種アミノ酸
Heat Shock Proteins
ポリ- γ -グルタミン酸

Coutinho *et al.* (1998) *J. Biotechnol.*
Izawa *et al.* (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
Takagi *et al.* (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
Kaul *et al.* (1992) *Cell. Mol. Biol.*
Yokoigawa *et al.* (2006) *J. Biosci. Bioeng.*

↓

遺伝子組み換えにより酵母冷凍耐性向上は可能



遺伝子組換え体を利用した食品製造は現実的には不可能

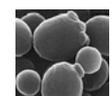


遺伝子操作に頼らない技術開発が必要

遺伝子操作



×



食品微生物

可食天然成分



OK

↓

微生物機能を改良

↓

食品の品質・機能・コストの改善

目的 **酵母の冷凍耐性を改善する可食天然成分を探索**

大豆ペプチド (Soy peptides) に着目



- ・ 大豆油の搾りかすをプロテアーゼで分解
- ・ 食材・培地として利用可能
- ・ 腸からの吸収が容易

高等動物における生理的作用

- ・ コレステロール軽減作用 Hori *et al.* (2001) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- ・ 抗脱毛効果 Tsuruki *et al.* (2003) *FEBS Lett.*
- ・ 抗酸化能 Takenaka *et al.* (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- ・ 疲労回復効果

など多数報告

他の生物種に対する効果や有効利用は限られた情報しかない

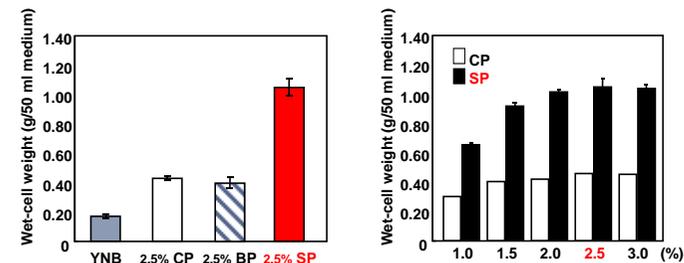
酵母に対する効果は???

大豆ペプチド

Profile of Soy Peptide		Amino acid (g/100 g SP)	
Dry matter	94.1 %	Asp	9.71
Protein content	83.7 %	Thr	3.19
free amino acids	27.2 %	Ser	4.28
peptides	72.8 %	Glu	16.0
Ash	7.3 %	Gly	3.41
Vitamin		Ala	3.46
biotin	0.421 µg/g	Val	4.01
pantothenate	1.5 µg/g	Cys	1.00
inositol	5.3 mg/g	Met	1.04
niacin	7.1 µg/g	Ile	3.85
vitamin B6	1.3 µg/g	Leu	6.50
riboflavin	1.3 µg/g	Tyr	3.12
thiamine	1.1 µg/g	Phe	4.41
Mineral		His	2.22
Zn	35.2 µg/g	Lys	5.18
Mn	15.1 µg/g	Arg	6.36
		Pro	4.40
		Trp	1.05
	Av. MW = 692		

Kitagawa et al. (2008) J. Biosci. Bioeng., 105, 360

酵母の生育に対する大豆ペプチド培地の効果

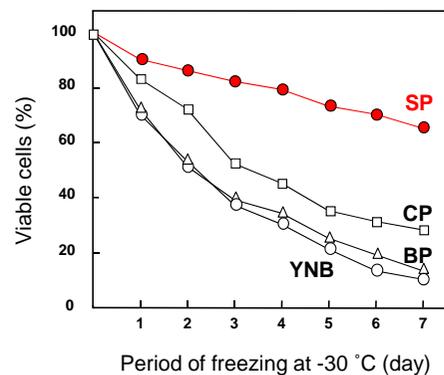


Cells were cultured at 28 °C for 80 h (120 rpm) in 800 ml medium.

YNB medium 最小合成培地 (2% glucose)
 CP medium Casein pepton + 2% glucose
 BP medium Bacto pepton + 2% glucose
 SP medium Soy peptides (Av. MW = 692) + 2% glucose

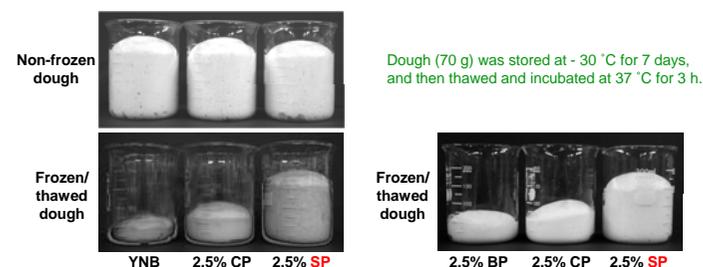
大豆ペプチド培地による培養で酵母菌体収量が大幅に改善された。

酵母の冷凍耐性に対する大豆ペプチド培地の効果



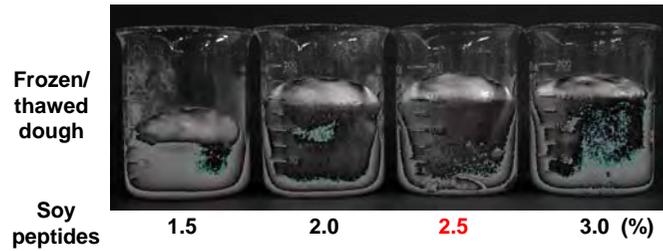
大豆ペプチド培地による培養で冷凍耐性が大幅に改善された

冷解凍後の生地における残存発酵力 (gassing power) の比較



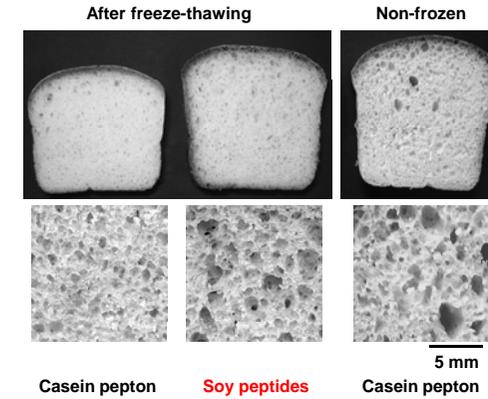
大豆ペプチド培地で培養した細胞は、
 解凍後のパン生地中でも高い発酵力を保持していた

残存発酵力に対する大豆ペプチド濃度の影響



2.5% 大豆ペプチド培地で培養した細胞が
解凍後のパン生地中で最も良好な発酵力を示し
た

焼成後の食パンの品質



大豆ペプチド培地で培養した酵母を利用した冷凍パン生地は
焼成後も良好な外観・食感・風味を呈した

要約

大豆ペプチド培地は

- ・ 酵母の培養効率・菌体収量を改善した
- ・ 酵母の冷凍耐性を改善した



大豆ペプチドで培養した酵母を用いた冷凍パン生地は

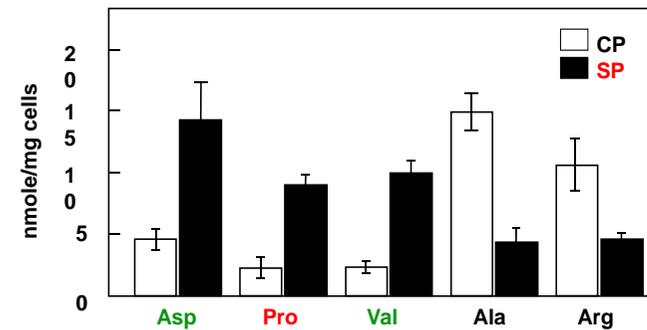
- ・ 解凍後も十分に発酵・膨張した
- ・ 焼成後のパンの外観・食感・風味も良好



遺伝子組換えに頼らない食品微生物の機能改良



細胞内遊離アミノ酸の比較

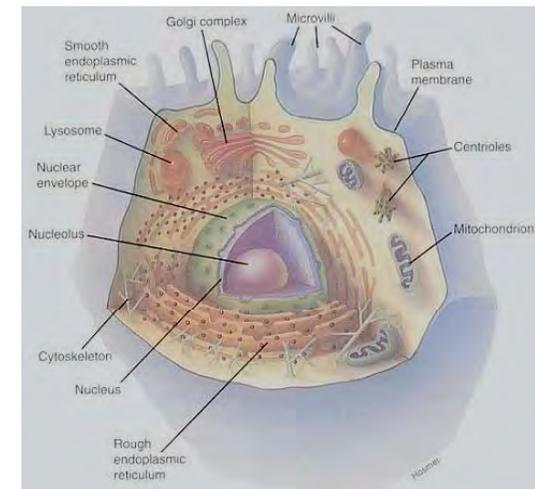


大豆ペプチド培地で培養した酵母細胞は細胞内プロリンレベルが上昇

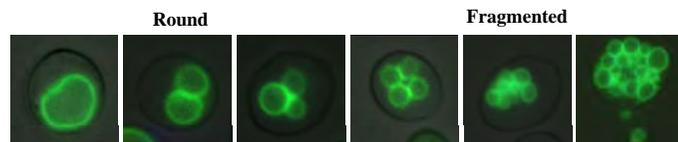
酵母細胞に対する大豆ペプチドの作用機構の解析

細胞内リピッドボディ形成の抑制

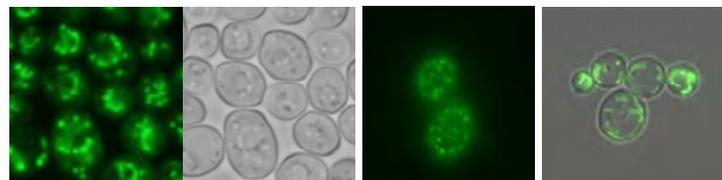
Yeast = Eukaryote



ダイナミックな酵母オルガネラ形態の変化



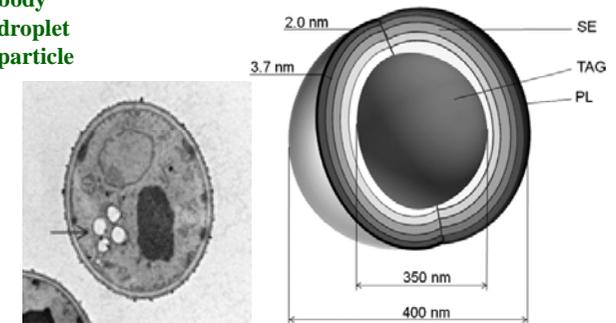
熱ショック
エタノール
低浸透圧 ← vacuoles → 高浸透圧



Lipid body Microdomain Mitochondria

酵母リピッドボディ (脂肪滴)

Lipid body
Lipid droplet
Lipid particle

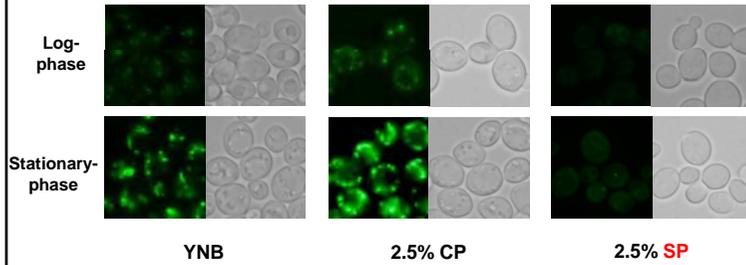


Czabany et al., *J. Biol. Chem.*, **283**, 17065 (2008)

過剰なステロールとジアシルグリセロール(DAG)は脂肪酸とエステル化されて、それぞれステロールエステル(SE)とトリアシルグリセロール(TAG)として脂肪滴(LB)に隔離・貯蔵される。LBは小胞体膜上で形成されると考えられている。LBは単層のリン脂質膜に包まれ、膜上にはTAGリパーゼやSE加水分解酵素など約40種のタンパク質が局在する。

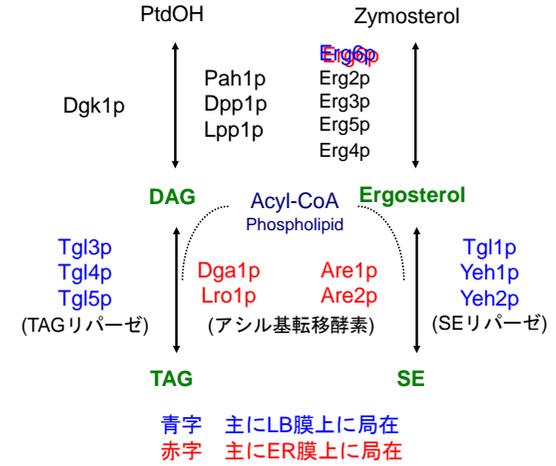
酵母リポッドボディ形成に対する大豆ペプチド培地の効果

Nile Red staining

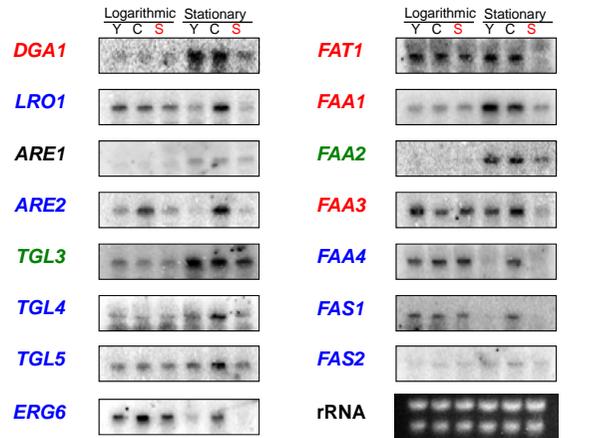


大豆ペプチド培地による培養はリポッドボディ(LB)の形成を抑制した

酵母のTAG・SE代謝経路

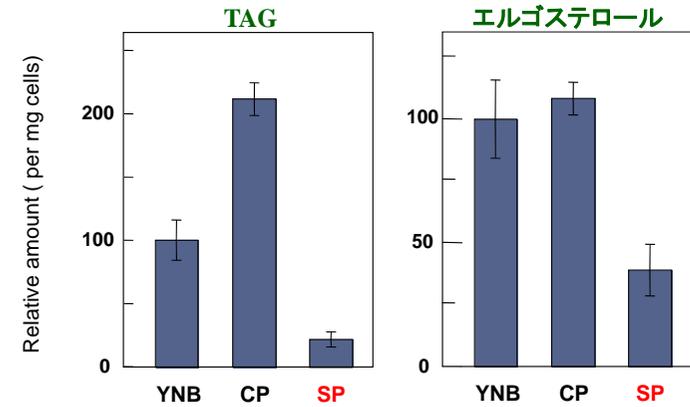


脂質代謝関連遺伝子の転写レベルに対する影響



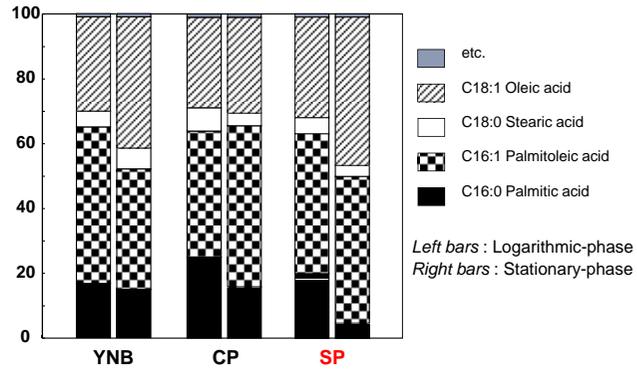
FAT FAA 脂肪酸の輸送と活性化因子 FAS 脂肪酸合成酵素

中性脂質レベルの比較

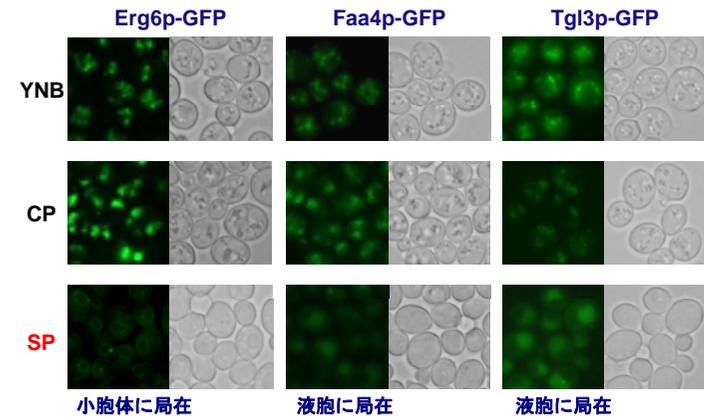


大豆ペプチド培地により総TAG量・エルゴステロール量が減少した

脂肪酸組成への影響

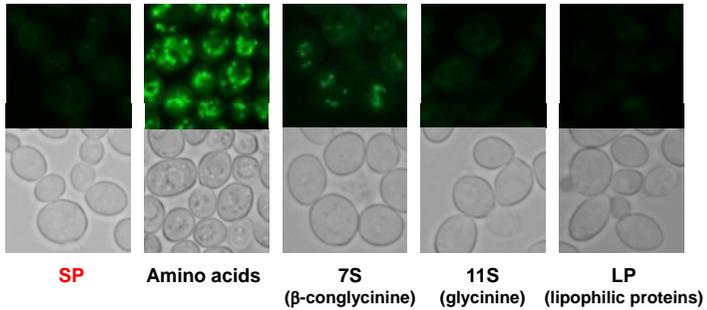


脂質代謝関連酵素の細胞内局在の変化



大豆タンパク質由来成分の検討

Nile Red staining



大豆の主なタンパク質成分 7S (約30%) 11S (約30-50%) LP (約30%)

大豆ペプチド培地と同じアミノ酸組成の合成培地や、7S β-コングリシニン由来ペプチド培地ではリピッドボディ形成は抑制されなかった

→→→ 11SやLP由来の機能性ペプチドの存在を示唆

要約

大豆ペプチドによる酵母細胞の培養で

- ・リピッドボディの形成が抑制
- ・細胞内中性脂質レベルが低下
- ・定常期におけるアシルトランスフェラーゼ遺伝子 *DGA1* と TAG lipase 遺伝子 *TGL3* の転写レベルが低下
- ・同組成のアミノ酸培地にはリピッドボディ形成抑制効果無し
- ・リピッドボディ形成の抑制効果は11S or LPタンパク質由来

→→→ DAGおよび脂肪酸の代謝系に対する影響を検討予定

展望



出芽酵母を用いた解析により

- 細胞レベルでの新規機能性の探索
- 分子レベルでの作用機構の解析
- 応用分野への活用

を効率的に遂行することが可能

