

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300273

研究課題名（和文）パンの欠片で何がわかる！-発酵食品の機能性成分と微生物遺伝子分析-

研究課題名（英文）What can you tell from a piece of Bread! - Fermented food functional components and microorganism genetic analysis -

研究代表者

長野 宏子（NAGANO HIROKO）

岐阜大学・教育学部・教授

研究者番号：40074984

研究成果の概要（和文）：

パンは昔から世界中で食され、多種類の伝統的なパンが製造されている。採集したパン欠片の微生物は、顕微鏡観察により多くの試料で卵型の酵母や桿菌等が多種類の微生物が関与していた。小麦アレルゲンタンパク質の分解がみられた。*S. cerevisiae* 保存菌株、さらにパン欠片からの DNA 抽出は可能であり、パン欠片中の酵母は、国、地域によって異なっていた。市販天然酵母とそれを用いたパンは、近い位置関係を示した。さらに、石窯やオーブンによるパン焼成法による影響は少なく、同クラスターを形成した。

研究成果の概要（英文）：

Bread has been a popular food from ancient times all over the world. Traditional breads including naan, chapati, and montou are produced in stone ovens, tandoors, or other types of oven, with steam, or other means. Microorganisms including yeast as well as *Bacillus* and *Lactococcus* could be observed microscopically, which means that a variety of microorganisms are involved in the fermentation process. Proteins in the bread were converted to lower-molecular-weight molecules, particularly those in the 15-16 kD and 31-37 kDa bands, resulting in decreased allergens with microorganisms. By combination of intermediate alleles, the genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* from NBRC and bread samples showed them to be different between regions and countries. Dry commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast used in bread were the closest in the neighbour-joining tree, showing the validity of the results. In addition, the effect of heating method (oven, frying, steaming) was small, and formed the same cluster.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,300,000 | 1,890,000 | 8,190,000 |
| 2010年度 | 4,400,000 | 1,320,000 | 5,720,000 |
| 2011年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：パン、発酵食品、アレルギータンパク質、微生物、*Saccharomyces cerevisiae*、
遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

パンは、世界各地の自然環境下に育つ小麦などの食材を用い、独自の加熱方法で地方独特のパンが食されている。発酵食品パン（かけら）中の小麦粉等の穀類たんぱく質は、微生物酵素により分解され低アレルギー化されている。また、小麦アレルギーのエピトープ部分の解析や各種酵素を用いた低アレルギー化の報告¹⁾もある。興味深いことに伝統的なパン（ドウ）中にはパン酵母のみでなく、*Bacillus* 属等が存在しており²⁾、各種酵素を産生し低アレルギー化している。一方、パンづくりに欠かせない酵母 *Saccharomyces cerevisiae* について新しい興味深い報告³⁾がある。世界中の56地域より、パン、ビールとワイン酵母の保存菌株651菌株を分析した酵母の地域性のある系統図³⁾である。パン酵母29株であるが、イタリアのシシリー島で分離されたものと、フランス、スペイン、日本などからの保存株とは僅かながら別の系統を示している。本研究は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* だけではなく、また、保存菌株のみではなく、世界のパンの「かけら」や「ドウ」の微生物の遺伝子解析であり、紀元前から人々の暮らしを支えたパンの微生物を明らかにするものである。以上のように、世界のパンの「かけら」や「ドウ」を探索・保存し続けてきたことの蓄積を土台にした研究である。

- 1) Isolation and Characterization of a Novel Polysaccharide as a Possible Allergen Occurring in Wheat Flour. Tanabe S., Watanabe J., Oyama K., Furushi E., Arai S., Nakajima T and Watanabe M. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**(8) 1675-1680(2000)
- 2) 伝統的な小麦粉発酵食品中の微生物とその働き。長野宏子・説田佑子・粕谷志郎. 日本家政学会誌, **54**, 713-721 (2003).
- 3) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Jean-Luc Legras, Didier Merdinoglu, Jean-Marie Cornuet and Francis Karst. *Molecular Ecology*. **16**, 2091-2102 (2007)

2. 研究の目的

20年間収集した約800種類の世界中のパン「かけら」の特徴（アレルギー、機能性）を明らかにし、食由来微生物酵素を利用し、昔から学び機能性パンを試作することである。また、パンの機能性に関与している「ドウ」中の微生物の特徴を明らかにするため、パンづくりに欠かせない酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、プロテアーゼ活性のある *Bacillus* 属等、GABA 産生する *Lactobacillus* 属の3種類の微生物遺伝子解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

機能性解析グループ

世界のパン（饅頭）のかけら約800種から微生物形態観察後、パンのタンパク質については、①パン中のたんぱく質抽出を行い、高分子部分は SDS 電気泳動、低分子部分の分解物は、「高速液体クロマトグラフ」によりアミノ酸分析を行う。②SDS 電気泳動後、患者血清を用いてイムノブロット法により、抗原抗体反応を行う。アレルギー部分をメンブランにブロッティング後、アミノ酸シーケンサーにかける。③小麦の検出のため市販されている省令特定原料検査キットにより、パンの ELISA 測定を行う。④抗酸化性については、吸光度計によりラジカル反応の分析をおこなう。

パン試作のために①食由来微生物 *Bacillus* 属、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、*Lactobacillus* 属を小麦に作用させた試作パン作成と評価（官能検査、物性測定）②パンの「かけら」中のタンパク質を、二次元 SDS 電気泳動により分離後、HPLC によるペプチドを分離し、プロテオーム解析（N 末、内部アミノ酸シーケンス、PMF (Peptide Mass Fingerprint) 分析等）を行う。③試作パンと世界のパンのアレルギータンパク質を ELISA 測定により比較する。

パンの微生物遺伝解析グループ

生物多様性条に基づいて採集したドウ中の①プロテアーゼ活性の強い菌株 (*Bacillus* 属) や新たに、血圧降下作用のある γ -アミノ酪酸 (GABA) 産生に関わる *Lactobacillus* 属を分離し微生物の同定を 16S rDNA を用いて行う。②生きているパン酵母の系統樹作成：保存パン酵母や天然パン酵母を培養し、DNA

抽出を行なう。パン酵母で多型が報告されているマイクロサテライト 12 領域を増幅し、遺伝子型を決定する。その結果をもとに系統樹を作成し、それぞれの菌の系統関係を明らかにする。③パン中の死滅パン酵母の DNA を抽出する方法については、法医学の分野で、微量かつ劣化した試料からの DNA 抽出が多く工夫されているため、その方法を応用する。抽出した DNA を用いて、生菌と同様にマイクロサテライトの遺伝子型を決定し、系統樹を作成する。④パン中の死滅 *Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属の同定とパンに関与微生物の系統解析を生菌と同様に行う。解析データを基に地域性や市販酵母との系統関係を明らかにし、機能性パンとするための提言を行う。

4. 研究成果

世界には地域により、焼く、蒸す、揚げるなどの調理法があり、様々な種類のパンが存在している。焼成温度の異なる石窯パンの特徴を検討した。焼成温度によるパン中のタンパク質含量をみると、焼成前のドウの 1/4 近い値に減少し、また、焼成温度の違いからタンパク質含量をみると、240°C のパンに比べ、他の焼成温度のパンは約 8 割に減少した。タンパク質含量の減少は、パン酵母の発酵によりタンパク質が分解されたこと、加熱によりタンパク質が不溶化したことなどが考えられる。

抽出条件による、つまり 0.5M NaCl で抽出した塩可溶性遊離アミノ酸と、SDS 等で抽出した塩不溶性遊離アミノ酸の遊離アミノ酸含量を比較した。塩不溶性遊離アミノ酸含量が多く、塩可溶性遊離アミノ酸含量は、ドウおよびパンとも 5~6 割であった。ドウと焼成したパンの遊離アミノ酸含量をみると、塩可溶アミノ酸含量は、焼成温度の影響を受け、高温焼成パンになるに従い約 4 割弱まで減少した。塩不溶遊離アミノ酸含量も同様であり、焼成温度が高くなるにしたがって減少の傾向を示したが、塩可溶遊離アミノ酸より若干少ない減少であった。以上の結果から、パン中のタンパク質および遊離アミノ酸含量の減少は、パン酵母の発酵によるタンパク質の分解が少なく、焼成中にグルテンタンパク質は不溶化し、遊離アミノ酸はグルテンタンパク質およびデンプン粒子に固定されることが考えられる。

糖質成分の還元糖は、焼成温度の上昇とともに、わずかに増加した。グルコースおよびマルトースの変化は少なく、マルトースの値は焼成温度の上昇とともに減少傾向であった。ドウと比較してパンではマルトース含量は、3~4 倍に増加し、高い値であった。このことは、また、酵母由来の酵素は菌体内酵素

であり、糖分解への寄与が少ないことから、マルトースは小麦粉由来のアミラーゼによって生成したと考えられる。焼成温度の上昇によってマルトースは一部、熱分解された可能性も考えられる。焼成温度に伴い、還元糖が増加した理由としては焼成によってデンプンなどが化学的に熱分解し、マルトースやマルトトリオースよりも長鎖のオリゴ糖になったとも予想されるが詳細は不明であり、今後の検討が必要である。

パン中の遊離アミノ酸含量は、石窯とオープンによる焼成法に関わらず、焼成温度とともに減少していた。パン中のアミノ酸は、プロリン、アラニン、バリン、アルギニン、グルタミン酸が多く含まれていた。

焼成温度の異なった石窯パンは、焼成温度の上昇とともに、タンパク質は分解し低分子化しており、アレルゲンタンパク質の 15-16kDa 及び 31-37kDa 付近のバンドが薄くなっていた。ELISA 測定により、270°C および 300°C の焼成パンの小麦タンパク質抗原量はドウに比べ低下した。抗酸化性は、焼成温度の影響を受けないことが明らかになった。

世界のパン欠片を小麦や大麦、米、いも、とうもろこしなどの主要農作物との関わりを検討した結果、パン中の微生物は、全てに酵母と形態の異なる乳酸菌などの微生物が存在していた。小麦タンパク質の分解が多く見られ、小麦アレルギー患者の反応するタンパク質が減少していた。また、日本各地の天然酵母パン中にも、微生物の形態に差があり、小麦タンパク質アレルギー 30kDa 付近の小麦タンパク質の減少が見られたものもあり、血圧降下作用のある GABA 等のアミノ酸含有も多かった。低アレルゲン表示が記載された天然酵母パンは、アレルゲン部分が残っているものもあり、卵や牛乳などを含んでいないことを表示していることが考えられた。

パンの機能性に関与している「ドウ」中の微生物の特徴を明らかにするため、中国の饅頭ドウから分離した 8 株、日本の天然酵母 2 株、NBRC の *S. cerevisiae* 保存株 1 株、26S および ITS 領域の DNA 塩基配列を解析した結果、分離 CH-25、天然酵母 2 種類、*S. cerevisiae* 保存菌株 1 株の 4 株を *S. cerevisiae* と同定した。また、材料の小麦由来と思われる *Cryptococcus laurentii*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Cryptococcus flavus*、*Ustilago esculenta* を同定した。このことからパン発酵へ関与するもの、材料由来のと思われる多種類の微生物が確認できた。*S. cerevisiae* と同定した 4 株の塩基配列の相違は 4 ヲ所のみであった。26S および ITS 領域の塩基配列解析に用いた 11 試料に、焼成(オープンと石窯)法の異なるパン 2 試料、市販酵母 1 試料、NBRC の *S. cerevisiae* 保存菌株 4 株を加え、マイクロサテライト

解析を行った結果、中国の饅頭ドウから分離した *S. cerevisiae*(CH-25)は日本の天然酵母と別系統であることがわかり、保存菌株(オランダ)とは同系統であった。また、市販酵母とその市販酵母を用いて焼成したパンから抽出した DNA 遺伝子は、同じクラスターを形成した。このことは、死滅微生物のつまり「パンの欠片」からの分析を可能にしたものであり、今まで報告の *S. cerevisiae* 保存菌株の系統樹と比較できる一歩となった。

日本にも天然酵母パンが全国に存在している。世界のパンに、日本の天然酵母パンを実験材料に加え、パン酵母の遺伝学的解析を行った。研究成果3年間のまとめとして国際家政学会にて (XXII IFHE World Congress 2012, Melbourne Australia) 「Diversity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the bread of the world」の発表を受理されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Xujun HAN, Hiroko NAGANO, Panthitra PHROMRAKSA, Michiko TSUJI, Makoto SHIMOYAMADA, Kasuya SHIRO, Tohru SUZUKI and Chirasak KHAMBOONRUANG, Hydrolysis of Soybean 7S and 11S Globulins Using *Bacillus Subtilis*, 査読有、*Food Science and Technology Research*, (2012) accept.
- ② Chen-Jian LIU, Fu-ming GONG, Xiao-ran LI, Hai-yan LI, Zhong-hua ZHANG, Yue FENG, Hiroko NAGANO, Natural populations of lactic acid bacteria in douche from Yunnan Province, China, 査読無、*J. Zhejiang Univ-Sci B*, (2012) In press.
- ③ 長野宏子、堀光代、粕谷志郎、下山田真、石窯パンの特徴におよぼす焼成温度の影響、査読有、日本家政学会誌、第62巻 第10号、2011、659-663.
- ④ Masayo IKEDA, Miyuki KATOH, Hiroko NAGANO and Shigeru SAWAYAMA, Characterization of the Composition and Bacterial Manufacturing Process for Rice Noodles in Cambodia, 査読有、*J. Home Econ. Jpn.* 第61巻 第2号、2010、91-99.
- ⑤ 堀光代、長野宏子、阿久沢さゆり、下山田真、吉田一昭、岐阜県産小麦粉の製パン性の検討-製粉法による粒度の面から-、査読有、日本調理科学会誌、第43巻 第1号、2010、31-37

[学会発表] (計8件)

- ① Xujun Han, Hiroko Nagano, Tohru Suzuki, Hirofumi Yashikawa, Yuh Shiwa, The Proteolytic *Bacillus subtilis* Strains & Their Extracellular Proteases, 日本農芸科学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学.
- ② 玉岡ひかり、堀光代、粕谷志郎、長野宏子、パンの欠片からみる微生物とパンの機能性、日本家政学会中部支部 (院生学生発表会)、2012 年 3 月 10 日、相山女学院大学
- ③ 木下真理、堀光代、阿久澤さゆり、長野宏子、岐阜県産米粉 (5 品種) における製パン性試験、日本調理科学会平成 23 年度大会、2011 年 8 月 30 日、高崎健康福祉大学.
- ④ 長野宏子、朽網友佳里、鈴木徹、庄司善哉、村山美穂、井上英治、パン欠片に存在するパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子解析、日本家政学会第 63 回大会、2011 年 5 月 29 日、和洋女子大学.
- ⑤ 安田怜未、堀光代、粕谷志郎、長野宏子、小麦伝統発酵食品中の微生物による低アレルギー化パンの特徴、日本家政学会第 63 回大会、2011 年 5 月 28 日、和洋女子大学.
- ⑥ Xujun HAN, Hiroko NAGANO, Tohru SUZUKI, Diversity analysis and characterization of proteases in *Bacillus subtilis* from fermented food, 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学.
- ⑦ 船越吾郎、安田 (吉野) 庄子、北本則行、木村與司雄、長野宏子、鈴木徹、製パン用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の効率的分離の検討、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学.
- ⑧ 都竹智恵子、長野宏子、粕谷志郎、堀光代、下山田真、石窯焼成によるパンの特徴、日本家政学会第 62 回大会、2010 年 5 月 30 日、広島大学東広島キャンパス.

[その他]

本研究の対象とした試料は、フィールド調査により採集したものや、旅する人から頂いたものである。一部であるがホームページに掲載している。さらに充実する予定でいる。

(<http://www1.gifu-u.ac.jp/~tabemono/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 宏子 (NAGANO HIROKO)
岐阜大学・教育学部・教授
研究者番号：40074984

(2) 研究分担者

粕谷 志郎 (KASUYA SHIRO)
岐阜大学・地域科学部・教授
研究者番号：20021438

鈴木 徹 (SUZUKI TOHRU)
岐阜大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号：20235972

下山田 真 (SHIMOYAMADA MAKOTO)
宮城大学・食産業学部・教授
研究者番号：60235695

村山 美穂 (MURAYAMA MIHO)
京都大学・野生動物研究センター・教授
研究者番号：60293552

堀 光代 (MORI MITHUYO)
岐阜市立短期大学・食物栄養科・講師
研究者番号：90320952

(3) 連携研究者

井上 英治 (INOUE EIJI)
京都大学・理学系研究科・助教
研究者番号：70527895