

中種法製パンにおける耐塩性酵母の寄与

毛利 哲¹, 大久 長範²

¹宮城大学食産業学群, ²地域創生ビジョン研究所

概要 10%食塩培地で小麦粉(2%)を4日間培養したもの(10%食塩集積培養)を小麦粉生地添加到したところ、小麦粉生地の膨張が促進することが分かった。この培養1 mlの中には 9×10^8 の耐塩性酵母が存在し、ガスを発生する能力のある耐塩性酵母 *H. burtonii* で代表された。*H. burtonii* の液体培養と従来の酵母を併用すると直種法により製パンすることができた。耐塩性酵母併用法は比容積とクラムの硬さの点で中種法に匹敵する製パン法と考えられた。

1. 研究目的

パンは、小麦粉に水を加えて捏ねた生地が、酵母の発酵によって発生する炭酸ガスで膨化し焼き上げる食品である。パンの基本原料は小麦粉、酵母、食塩、砂糖、水である。小麦粉は、通常たんぱく質含量が11~13%の強力粉を用いる。製パン法は主に直捏法と中種法があり、それぞれに特徴がある^{1,3)}。直捏法は、全原料を同時に仕込み発酵させる方法である。製パンの所要時間は短い、生地の機械耐性が悪いため量産に適さず、ベーカリーに向いている。中種法は、初めに約70%の小麦粉に酵母と水を加えて生地を作り、長時間発酵(前発酵)させたあと、残りの原料を加えて本捏ねと本発酵を行う方法である⁴⁾。小麦粉の品質や発酵条件等の影響を受けにくい大量生産に適している。またパンの日持ちも良いなどの長所がある。しかし中種法は所要時間が長くベーカリーに向いていないという欠点があった。中種法に類似した「パン種」に老麺がある。十分に発酵させたパン生地の一部を残しておき、新しい生地を仕込むときの発酵種として使う製パン法である⁵⁾。老麺法は酵母その他を含むパン生地を使用する。著者らは、小麦粉から分離した耐塩性酵母を併用すると中種法に匹敵する製パンが可能であることを見出した。

2. 研究方法

2.1 実験材料

パン酵母(日清製粉)、小麦粉(日清製粉、カメリア)、食塩(塩事業センター)、上白糖(三井製糖)は市販品を用いた。

2.2 菌数と酵母数測定

培養液中の微生物測定には、3M Petrifilm™ のカビ・酵母迅速測定用プレート(RYMプレート)、乳酸菌数測定用プレート(LABプレート)、生菌数測定用プレート(ACプレート)を使用した。滅菌水を作成し 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^7 と段階希釈を行い、プレート培地にそれぞれ1 mlずつプレートアウトした。そして30°Cの環境で2日間静置しコロニー数をカウントした。

耐塩性酵母数を測定するために、滅菌した10%食塩水を準備した。通常酵母生菌数測定と同様に小麦粉懸濁液を10%食塩水で段階希釈した後、希釈液をフィルム培地に重層した⁶⁾。このフィルム培地を28°Cで1週間培養し、出現したコロニーを計測した(2連)。

2.3 製パン法

直捏ね法の場合、強力粉300 g、乾燥酵母3 g、砂糖12 g、食塩6 g、脱脂粉乳6 g、植物油12 g、水201 gを秤取った(表1)。生地のミキシング(捏ね)と発酵は餅つき機のパンコース(室温)で行い、ミキシングから一次発酵終了まで70分を要した。発酵後に生地を約40 gに分割し丸めた。金属製天板に丸めた生地を載せ、皿の上部をラップフィルムで覆った。次に38°Cに設定した恒温器で60分間二次発酵させた。最後に電気オーブン(東芝、オーブンレ

ンジ ER-C7)を使用し、発酵終了生地を 200°Cで 13 分間焼成した。

中種法の場合は強力粉 210 g, 乾燥酵母 3 g と水 140 g を秤取り捏ね, 4時間 28°Cで保温した(前発酵とする)。4 時間後に残りの原料を加えた(表 1)。これを直捏ね法と同様にミキシング, 一次発酵, 二次発酵, 焼成までを行った。焼成パンを 1 時間放冷後, 重量と容積を測定した。容積は菜種置換法により求め, パンの比容積(cm^3/g)を算出した¹⁶⁾。

2. 4 耐塩性酵母と乾燥酵母を併用するパン(本法)

強力粉 60 g, 食塩 1.2 g(小麦粉に対して 2%)あるいは 6 g(小麦粉に対して 10%), 水 40 g を秤取り, これらをステンレス容器で 3 分間手捏ねした。この生地をラップフィルムで包み 28°Cで 12 時間保温した(前発酵)。12 時間保温した前発酵生地と強力粉 240 g, 乾燥酵母 3 g, 砂糖 12 g, 食塩 4.8 g, 脱脂粉乳 6 g, 植物油 12 g, 水 161 g を秤取った。これを直捏ね法と同様にミキシングから焼成までを行った。

2. 5 生地の物性測定

上記 2. 3 および 2. 4 で調製したパン生地 20 g をプラスチックシャーレ(直径 9 cm, 高さ 2 cm)に詰めた。熟成した生地の硬さ(N/m^2)をテクスチュロメーター(有限会社タケトモ電機, Viscoelasticity)を用いて 1 バイト測定により調べた(5 連複)¹⁷⁾。測定条件は以下の通りである。V 型プランジャー刃幅 2×20 mm, ロードセル 10 kg, ディスタンス 30 mm, クリアランス 0.1 mm, バイト速度 2 mm/s。

2. 6 パンの物性測定

試作したパンの物性を調べた。家庭用スライサー(ミナト電機工業株式会社)でパンを 1 cm の厚さにカットし, 硬さはテクスチュロメーター(有限会社タケトモ電機, Viscoelasticity)で 1 バイト測定した(5 連複)。クラム上部から 50%押し込んだ時の単位面積当たりの応力を硬さとした(N/m^2)。測定条件は, V 型プランジャー刃幅 2×20 mm, ロードセル 10 kg, ディスタンス 30 mm, クリアランス 5 mm, バイト速度 2 mm/s。なおこれらの測定は焼成した翌日に行い, 物性測定は 2 日間測定した。

2. 7 PCR

単離した酵母の同定を目的として, 単離酵母から Takara Gen とるくん(酵母用)を用いて DNA を抽出した。次に, リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域を Gene Amp® PCR System 9700 を用いて増幅し, シーケンス反応を行った後, ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定した。プライマーは ITS4(5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3)と ITS5(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3)を用いた¹⁵⁾。決定した ITS 領域の塩基配列は NCBI BLAST の DNA データベース(DDBJ/EMBL/GenBank=INSD) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)で相同性検索を実施し, 分離酵母の種段階の同定を行った。

2. 8 統計処理

平均値の差の検定は, SPSS(Ver.18 for Windows)を使用し, 一元配置分散分析および Turkey の多重比較検定で行った。

表 1 パンの試作に使用した材料組成

材 料	比率(%)	直捏法(g)	中種法(g)		耐塩性酵母法
			元種	本捏	
強力粉	100	300	210	90	300
乾燥酵母	1	3	3		3
砂糖	4	12		12	12
食塩	2	6		6	
脱脂粉乳	2	6		6	6
油脂	4	12		12	12
水	67	201	140	61	培養物* 201

*30°Cで 12 時間保温した。

3. 実験結果及び考察

3.1 10%食塩集積培養の利用

小麦粉に酵母と水を加えて小麦粉生地の膨張を追跡したのが図1である。10%食塩培地で小麦粉(2%)を4日間培養したもの(以下は10%食塩集積培養とする)を小麦粉生地に添加したところ、小麦粉生地の膨張が促進することが分かった(図1)。

10%食塩集積培養の中の微生物菌叢を表2に示す。この培養1mlの中には 9×10^8 の耐塩性酵母が存在していた。10%食塩で小麦粉を4日間培養すると耐塩性酵母が集積すると考えられた。

3.2 小麦粉生地から耐塩性酵母の分離と同定

図2に小麦粉生地から酵母を分離し同定したプロセスを示す。10%食塩集積培養から147株を分離し、その内24株を*H.burtonii*と同定した。10%食塩集積培養は、ガスを発生する能力のある耐塩性酵母*H.burtonii*で代表されると考えられた。

H.burtonii M2の培養を小麦粉生地に添加し生地の膨張を追跡したのが図3である。*H.burtonii*の培養は10%食塩培地集積培養と同様に、小麦粉生地の膨張が促進した。

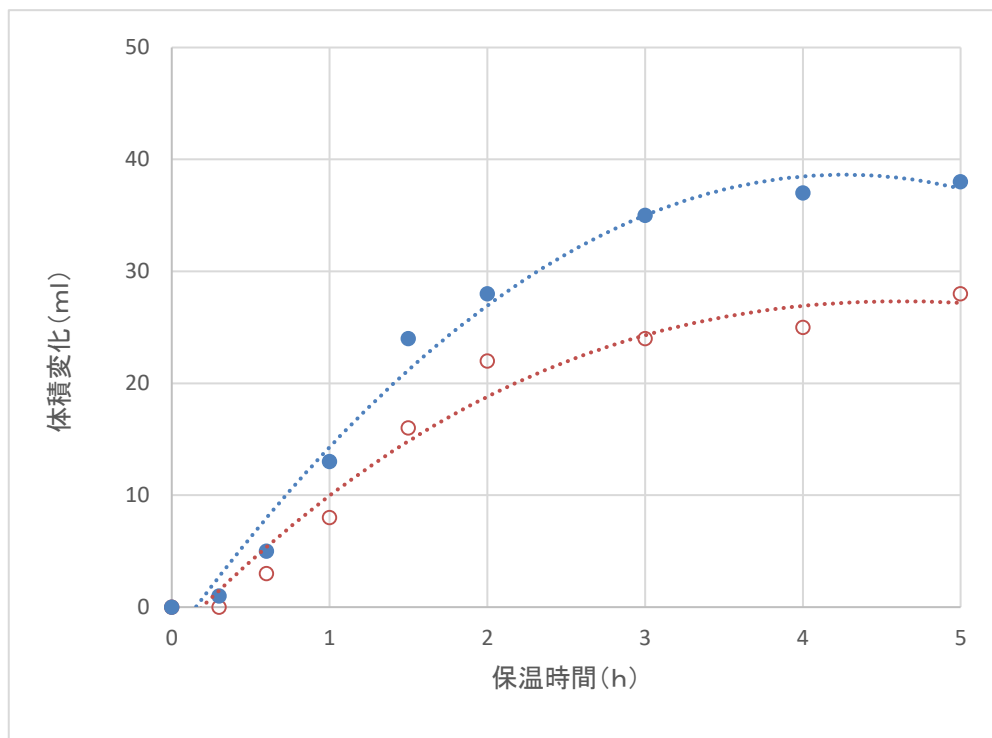


図1 10%食塩集積培養を小麦粉に加えた場合の生地体積の変化

○:小麦粉, 乾燥酵母, 水 ●:小麦粉, 乾燥酵母, 水+10%食塩集積培養(10%食塩培地で小麦粉2%を28°Cで4日間培養した)。

表2 10%食塩集積培養の中の微生物菌叢

微生物群	cfu/ml 培養*
一般生菌数	5×10^4
乳酸菌	4×10^2
耐塩性酵母	9×10^8

*3Mのフィルム培地で測定した。

小麦粉生地からの酵母の分離・同定

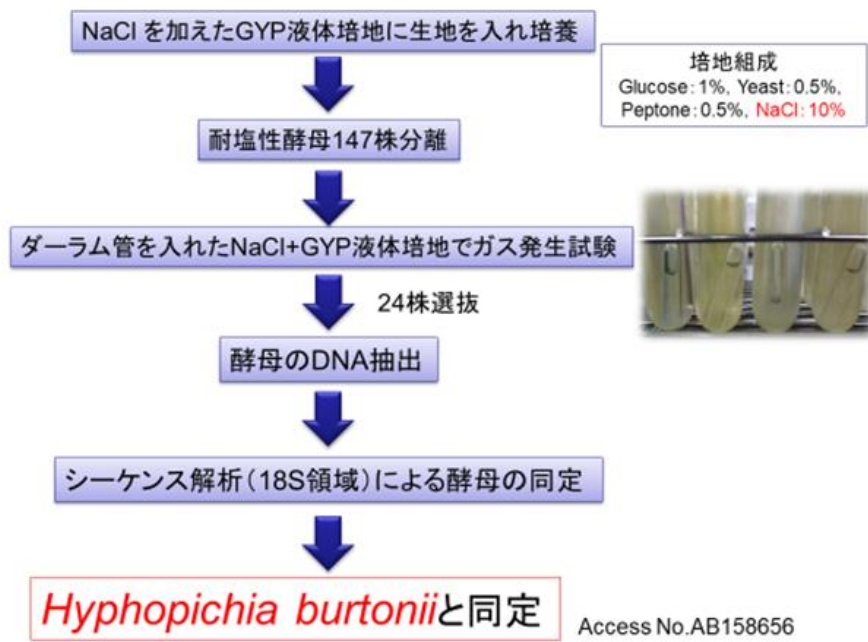


図2 小麦粉生地から耐塩性酵母を分離と同定

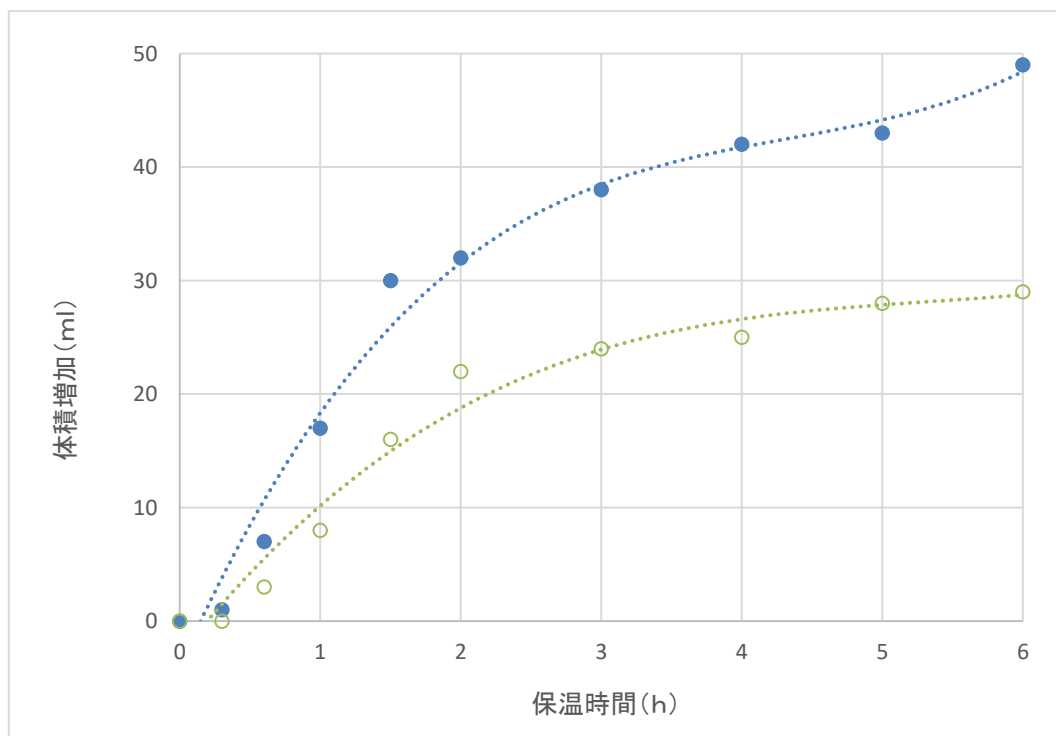


図3 *H. burtonii* の培養を小麦粉生地に添加し生地体積の変化
○:小麦粉, 乾燥酵母, 水 ●:小麦粉, 乾燥酵母, 水+*H. burtonii* の培養

3.3 耐塩性酵母を併用した製パン性

乾燥酵母の直種法、乾燥酵母中種法、および乾燥酵母と *H.burtonii* を併用する方法で製パンしたパンの比容積(膨化率)の結果を図 4 に示す。市販の乾燥酵母で作る直種法のパンでは比容積が 3.69 (ml/g)であった。これを中種法にすると比容積 4.0 を越えた。耐塩性酵母を併用したパンは、市販酵母を使用した中種法のパンと同等の比容積となった。

耐塩性酵母と市販酵母を併用(直種法)して製パンしたものは、柔らかさとふんわり感が強いパンであった。しかし培地成分であるペプトンと酵母エキス臭が強いため官能試験では好みが分かれた。従来の直種法のパンよりも様々な味を感じるという欠点が認められた。

3.4 耐塩性酵母の培養条件とパンの硬さ

培地成分であるペプトンと酵母エキスを最小限にするために培地組成を検討した。その結果、ペプトンと酵母エキスを 0.1%に減量した培地(最小培地)で酵母が 10^8 cfu/ml 培養に増加することが分かった(表 3)。

表 3 の組成で培養した *H.burtonii* を用い製パンした。製パン 1 日後と 2 日後にパンのクラムの硬さを測定した結果を図 5 に示す。市販酵母のみ添加した直種法のパンは、

ほかのもの比べて 1 日目, 2 日目ともに硬くなりやすい傾向がある。4種類の製パン法では最小培地(0.1%培地)で培養したもので製パンしたものは、最も柔らかさが保持されていた。また最小培地で培養したもので製パンしたパンは異味や異臭がなく、欠点が解消された。

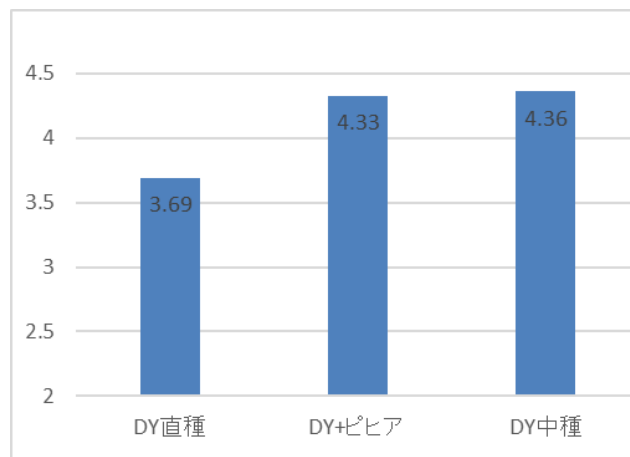


図 4 乾燥酵母と耐塩性酵母併用法で製パンしたパンの比容積

DY直種:乾燥酵母の直種法, DY中種:乾燥酵母中種法, DY+ピヒア:乾燥酵母と *H. burtonii* を併用した直種法

表 3 製パン用の耐塩性酵母 *H. burtonii* 増殖培地

	酵母エキス	ペプトン	強力粉	ショ糖	食塩	(酵母数)
液体培地	0.5%	0.5%		2%	2%	5.6×10^7
小麦粉培地			1%	2%	2%	3.7×10^7
最小培地	0.1%	0.1%		2%	2%	1.4×10^8

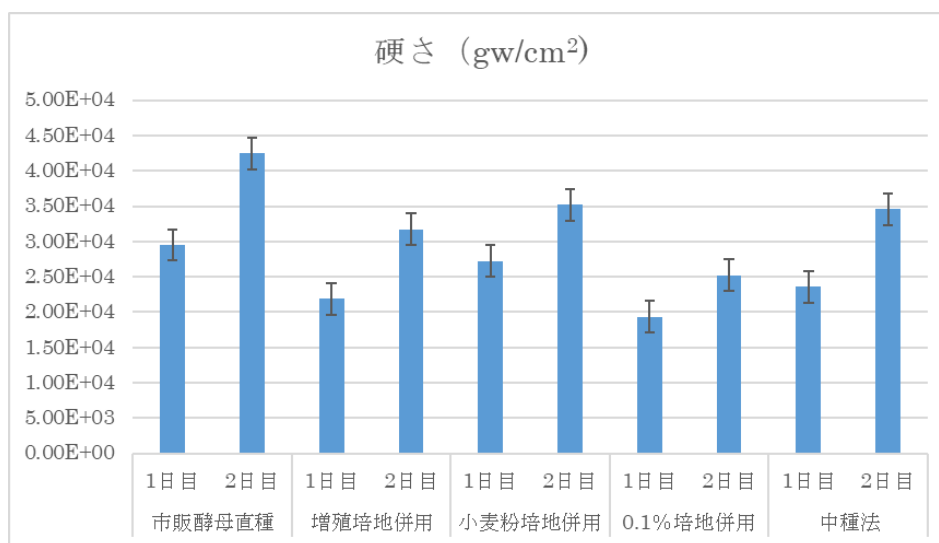


図 5 製パン後のパンクラムの硬さ変化

文 献

- 1) 吉野精一 (2011), 「基礎からわかる製パン技術」, 柴田書店, 東京, pp.8-33
- 2) 島 純, 小松崎典子, 吉田綾子, 安藤聡, 中村敏秀 (2013), パンづくりを支える微生物機能, 生物工学会誌, **91**,618-620
- 3) 田中康夫, 松本博編著 (1991), 「製パンプロセスの科学」, 光琳, 東京, pp.1-26, pp.99-166, pp.189-195
- 4) 田中康夫, 松本博編著 (1993), 「製パン材料の科学」, 光琳, 東京, pp.60-64, pp.181-187
- 5) 志賀勝栄 (2014), 「パンの世界 基礎から最前線まで」, 講談社, 東京, pp. 11-37, pp. 170-188.
- 6) 藤本章人, 井藤隆之, 井村聡明 (2012), 伝統的パン種のおいしさと微生物の関わりについて, 生物工学会誌, **90**, 329-334
- 7) 松尾志穂, 浜田知子, 米田寿子 (2002), 天然酵母利用パンについての評価, 九州女子大学紀要, **38**,25-37
- 8) 赤石(喜多)記子, 五月女まりえ, 小林愛美, 山下美恵, 長尾慶子 (2011), スペルト小麦パンの物性・機能性・嗜好性に及ぼす各種発酵液添加の影響, 日本調理科学会誌, **44**, 153-162
- 9) 八木葉奈子, 福山紗英子, 黒川正道 (2013), 青果物から分離した「天然酵母」の製パン試験, 化学と生物, **51**,129-131
- 10) 渡邊悟, 篠原尚子, 金井節子, 飯塚良雄 (2005), レーズンから分離した天然酵母のパン酵母としての特性, 聖徳栄養短期大学紀要 **36**,1-6
- 11) 小田有二, 山内宏昭, 田村雅彦 (1996), 産学官連携による製パン用「とち野酵母」の開発, 食品化学工学会誌, **43**,1243-1248
- 12) 鎌倉未貴, 眞山眞理(2012),スダチ花卉から分離した野生酵母 *Hanseniaspora meyeri* の製パンへの応用, 四国大学紀要(B), **34**, 37-46
- 13) 小玉健吉, 高橋慶太郎 (2001/7/3), 酵母, 冷凍パン生地, 乾燥パン酵母, 発酵食品, 含塩発酵食品及び発酵食品製造方法, 特許公開 2001-178449
- 14) 渡邊悟, 飯塚良雄 (2006/12/7), 天然パン酵母, 特許公開 2006-325562
- 15) 大久長範, 鈴木直樹, 三浦みどり, 遠藤耕介, 藤田安弘 (2012), 手延べ乾麺の空隙形成に関与する耐塩性酵母, 食品科学工学会誌, **59**, 442-446
- 16) 大羽和子, 川端晶子 (2003), 「調理科学実験」, 学建書院, 東京, pp.12-13
- 17) 山内彩子, 大久長範 (2013), 低アミロース米とマルトースを用いた硬化抑制米粉ゲル, 日本調理科学会誌, **46**, 271-274
- 18) 宮島千尋 (2009), アルギン酸類の概要と応用, 繊維と工業, **65**, 444-448
- 19) 辻啓介, 辻悦子, 鈴木慎次郎 (1978), 各種アルギン酸プロピレングリコールエステル脱コレステロール作用の比較, 栄養と食糧, **31**, 485-489
- 20) Takeuchi, A., Shimizu-Ibuka, A., Nishiyama, Y., Mura, K., Okuda, S., Tokue, C. and Arai, S. (2006), Purification and characterization of an α -amylase of *Pichia burtonii* isolated from the traditional starter “Murcha” in Nepal, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 3019-3024
- 21) 山内 宏昭, 藤村 昌樹, 大宅 甲三, 平川 完, 小林 猛(1992), ストレート法食パンの老化に対する油脂及びモノグリセリドの役割, 日本食品工学会誌, **39**, 383-390

Contribution of Salt-Tolerant Yeast in Bread Made by Sponge-Dough Method

Satoshi Mohri¹, Naganori Ohisa²

¹Miyagi University, ²Community Innovation Partnership

Summary

When 2% of flour which was cultured in 10% saline medium for 4 days (10% sodium chloride accumulation culture) was added to the flour, it was found that expansion of the flour was promoted. In 1 ml of this culture, there were 9×10^8 halotolerant yeasts represented by the halotolerant yeast *H. burtonii* capable of generating gas. The combination of liquid culture of *H. burtonii* and the conventional yeast enabled to produce bread by direct method. The salt tolerant yeast combination method was considered to be a new method comparable to sponge-dough method in terms of specific volume ($4.33\text{cm}^3/\text{ml}$) and crumb hardness.