

2種の天然パン酵母の製パン特性に関する研究

山田 密穂 (YAMADA Mitsuho)^{1,2*}, 小泉 昌子 (KOIZUMI Akiko)³,
峯木 眞知子 (MINEKI Machiko)³, 藤森 文啓 (FUJIMORI Fumihiro)⁴

Key Words: 白神こだま酵母, ホシノ天然酵母パン種, パン酵母, 遺伝子解析, 発酵, テクスチャー特性, 走査型電子顕微鏡

Study of bread-making characteristics of two natural baker's yeast.

Authors: Mitsuho Yamada^{1,2*}, Akiko Koizumi³, Machiko Mineki³, Fumihiro Fujimori⁴

* **Corresponding author:** Mitsuho Yamada

Affiliated institutions:

¹ Graduate school of Humanities and Life Science, Graduate school of Tokyo Kasei University.

[1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo, 173-8602, Japan]

² Natural Bread School Brezel. [1-3-25 Minamiurawa, Minami-ku, Saitama, 336-0017, Japan]

³ Tokyo Kasei University and Institute of Food Science of Egg. [1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo, 173-8602, Japan]

⁴ Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University. [1-18-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo, 173-8602, Japan]

Key Words: Shirakamikodama yeast, Hoshino natural leaven, *Saccharomyces cerevisiae*, genetic analysis, fermentation, texture property, scanning electron microscopic

Abstract

Shirakamikodama yeast (S) and Hoshino natural yeast leaven (H) are the most widely known bread yeasts. However, little is known about their properties and effects on bread-making. This study examined the bread-making characteristics of S and H, using instant dry yeast (D) as a control. S contains only yeast; H contains yeast, flour, rice and koji and D contains yeast, vitamin C and emulsifier. Thus, several substances other than yeast affect bread-making.

Additionally, all three yeasts were identified as *Saccharomyces cerevisiae* by sequencing the internal transcribed spacer region. Meanwhile, microscopic observation revealed differences in the shape and size of each yeast. The number of viable yeast cells per 1 g of product was approximately 1/10,000 less in H than in D and S. Analysis When the same number of viable yeast cells was used, H showed the fastest carbon dioxide generation rate (up to 460 min). Moreover, D produced the highest amount of carbon dioxide, while S and H generated similar amounts. Meanwhile, differences in volume, weight or specific volume were observed among breads prepared with an identical amount of viable yeast cells from each product.

D and S produced the softest and hardest breads, respectively, while H resulted in bread with intermediate hardness. Histological analysis revealed differences in the shape of air bubbles and condition of air bubble films. These findings suggest that although bread-making with H requires a longer fermentation time, using the same number of H yeast cells as D and S can increase the fermentation time to a comparable level while ensuring the same quality. The findings also revealed that although S does not require seeding, it has the same number of viable yeast cells as D, resulting in bread with a similar level of puffing within the same fermentation time. However, although both yeasts were identified as *S. cerevisiae*, it remains unclear whether the differences in the amount of carbon dioxide generated, bread firmness and bubble state were due to mutations in the yeast genome sequence or changes in gene expression. Therefore, a detailed analysis is required in the future.

連絡先: * 責任著者: 山田 密穂 (Mitsuho Yamada),

¹ 東京家政大学大学院人間生活学総合研究科 (〒 173-8602 東京都板橋区加賀 1-18-1)

² 自然派パン工房ふれっちえる (〒 336-0017 埼玉県さいたま市南区南浦和 1-3-25)

³ 東京家政大学タマゴのおいしき研究所 (〒 173-8602 東京都板橋区加賀 1-18-1)

⁴ 東京家政大学家政学部 (〒 173-8602 東京都板橋区加賀 1-18-1)

要約

天然酵母パンには、広く知られている白神こだま酵母（以下、S）、ホシノ天然酵母パン種（以下、H）等があるが、酵母の特性や製パンへの影響についての研究は少ない。対照酵母はインスタントドライイースト（以下、D）とした。Sの製品は酵母のみだが、Hは製品内に酵母、小麦粉、米、麴を含み、Dは酵母、ビタミンC、乳化剤を含んでいる。このため、酵母以外の物質による製パンへの影響が示唆された。本研究で用いている酵母は3種ともITS配列決定より *Saccharomyces cerevisiae* であるものを用いている。各酵母形態の顕微鏡観察では、形状および大きさの違いが明らかになった。製品1gあたりの酵母生菌数をカウントしたところ、HはDおよびSに比べて約1/10000と少なかった。酵母生菌数を同量にして検討した結果、炭酸ガス発生速度はHが460分まで早く、炭酸ガス発生量はDが最も多く、SとHは同等の値を示した。また、酵母生菌数を同量にして調製したパンでは、体積、重量、比容積で3試料間に差はなかった。かたさにおいてはD試料が最もやわらかく、S試料が最もかたく、H試料は中間の値を示した。組織観察においては、気泡の形状、気泡膜の状態の違いがみられた。以上のことから、Hによる製パンは発酵時間が長くかかるとされているが、D、Sと同数の酵母を用いることにより、D、Sと同様の発酵時間で品質の劣らないパンづくりが可能であることが明らかになった。また、Sは種起こしが不要であるにもかかわらず製品内にDと同等の酵母生菌数があり、同じ発酵時間で膨化のかわらないパンができることが示された。いずれの酵母も *S. cerevisiae* であったが、炭酸ガス発生量、パンのかたさ、気泡の状態の違いが、酵母の遺伝子配列の変異によるものか、遺伝子の発現変動によるものか未解明であり、今後より詳細な解析が必要である。

1. 緒言

近年、発酵種を利用したパン作りは世界的に拡大しており、発酵種に関する研究は単なる製パン改良にとどまらず、栄養や健康の観点からも重要視されてきた¹⁻³⁾。発酵種は、酵母と乳酸菌の混合体⁴⁾で、代表的な発酵種としてレーズン発酵種、酒種、ホップス種、ライサワー種等が挙げられる。発酵種にはパン生地物性の改善、風味の向上、保存性の向上、乳酸菌数増加による機能性の向上⁴⁾が期待できるというメリットがあるが、管理するのに手間と時間がかかり、製パンには経験に裏打ちされた技術を要する⁵⁾とされる。これに対して簡単に安定的な発酵種を作れるスターターとして市場に登場したのがホシノ天然酵母パン種である。ホシノ天然酵母パン種は、穀物に付着する酵母菌を取り込み、小麦、麴、水と共に培養して乾燥粉末化したもの⁶⁾で、ホシノ天然酵母パン種で作られたパンは、酵母と麴の組み合わせによりイーストとは異なる風味豊かな香りや熟成された旨味が出る^{6,7)}といわれている。また、ホシノ天然酵母パン種とともに市販天然酵母として広く知られるものとして、白神こだま酵母がある。白神こだま酵母は、白神山地から分離・選抜した酵母を通常のイーストと同様な方法で純粋培養した酵母製品⁸⁾で、従来の天然酵母のように種起こしの必要がなく、やわらかく風味のよいパンを焼くことができる⁹⁾とされ、学校給食への導入を図るため

の検討が行われている^{10,11)}。

ベーカリーの現場から家庭まで幅広く使用されているこれら市販天然酵母であるが、酵母の特性やパンに与える影響についての研究は少ない。先行研究では、ホシノ天然酵母パン種では、リテールベーカリーを想定した現場において、リーンな生地でのオーバーナイトストレート法の製品の品質が安定している⁶⁾ことが明らかにされている。また、リッチな生地において、添加量の違いによる最終製品へのプロテアーゼ活性の影響が示唆された¹²⁾。白神こだま酵母では下坂によって、生地の捏ね上げ温度の違いによるパンへの影響¹³⁾、国産小麦粉を用いて高品質なパン調製の可能性が示された¹⁴⁾。そこで著者らは、白神こだま酵母、ホシノ天然酵母パン種、対照酵母としてインスタントドライイーストの同一製品重量を用いて食パンを調製し、パンの品質および食味特性を比較・検討した¹⁵⁾。その結果、発酵試験、製パン試験においてホシノ天然酵母パン種試料は材料に含まれている麴由来のアミラーゼ、プロテアーゼがパンの品質に影響を与えていることが推察された。

白神こだま酵母の材料は酵母のみである¹⁶⁾が、ホシノ天然酵母パン種は製品内に酵母の他、小麦粉、米、麴を含み¹⁷⁾、インスタントドライイーストはビタミンC、乳化剤を含んでいる¹⁸⁾。このことから、それらの酵母以外の物質による製パンへの影響を排

除するため、酵母の単離・同定を行い、それぞれの酵母の形態・発酵能の違いを検討した。また、単離酵母を用いたパンを調製し、各酵母がパンに与える影響と特性を明らかにした。それら特性を明らかにすることにより、店舗や家庭製パンの現場において合理的な製造かつ品質の向上につながると考える。

2. 材料および実験方法

(1) 供試材料

実験に用いた酵母は、インスタントドライイースト（日清スーパーカメリヤドライイースト、(株)日清製粉ウェルナ、東京）（以下、D）、白神こだま酵母（白神こだま酵母ドライ、秋田十條化成(株)、秋田）（以下、S）、ホシノ天然酵母パン種（ホシノ天然酵母パン種、(有)ホシノ天然酵母パン種、東京）（以下、H）の3種とした。Hは顆粒製品（以下、HN）50gと蒸留水（30℃）100gを用いて、28℃の恒温器（VS-404WH、(株)ベルソス、広島）で24時間保温して生種起こし⁷⁾を行い、できあがった液状の生種（以下、HL）を実験に用いた。

(2) 実験方法

1) 培地

液体YPD培地は、Yeast extract 1.0% (Becton, Dickinson and Company, USA), Hipolypepton 2.0% (富士フィルム和光純薬(株)、大阪), Glucose 2.0% (富士フィルム和光純薬(株)、大阪) (pH 5.5) を使用した。平板培地は、上記液体培地にアガロスを2.0% (富士フィルム和光純薬(株)、大阪) となるように添加して用いた。液体培地、平板培地ともに調整を行い、121℃、20分間オートクレーブして用いた。

2) 酵母の単離

DおよびSはそれぞれ0.1gを滅菌水10mLに懸濁した。Hは、HNを用いて指定通りに種起こしを行ったHLを懸濁せずに用いた。これら30μLをYPD平板培地にプレーティングし、30℃、24時間培養した（バイオハザード対策用キャビネットMHE-130A、三洋電機(株)、大阪）。培養後、形成されたコロニーを白金耳で釣り上げ、新しいYPD平板培地に移植後、30℃、24時間培養し、分離菌株を得た。

3) 酵母の同定

2) で分離した酵母を同定するため、リボゾームRNA遺伝子のITS領域およびβ-tubulin領域をPCR反応にて増幅し、シーケンス解析によるITS領域およびβ-tubulin領域の塩基配列を明らかにした (data not shown)。菌体からのDNA抽出は、ISOPLANT (株) ニッポンジーン、東京) を用い、プロトコールに従い以下のように行った。YPD平板培地から白金耳で菌をかきとり、滅菌水1mLに懸濁し、1830×g、5分、4℃にて遠心分離機 (MX-300、(株)トミー精工、東京) で集菌した。ISOPLANT添付のSolution I 300μLを加え、ボルテックスミキサーで2秒攪拌し、Solution II 150μLを加え、ボルテックスミキサーで5秒攪拌した後、50℃15分静置 (DTU-Mini、タイテック(株)、埼玉) した。ついで、Solution III 150μLを加えボルテックスミキサーで2秒攪拌し、氷上に15分静置した。これを遠心分離 (12000×g、10分、4℃) し、上層 (水相) を500μL回収してエタノール沈殿を行った。得られた精製DNAをTEバッファー20μLに溶解し、PCR反応に供した。PCR反応に用いるプライマーは、ITS領域にはITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), β-tubulin領域にはBt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'), Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC-3') を使用した^{19,22)}。目的とする部位のPCR増幅は、KOD FX Neo (東洋紡(株)、大阪) を用い、DNAサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700、(株) ライフテクノロジーズジャパン、東京) を使用して、以下の条件で行った。PCR反応条件は、予備加熱94℃ 2分後、変性98℃ 10秒、アニーリング60℃ 30秒、伸長68℃ 30秒とし、変性から伸長までを40サイクル繰り返した。最後に72℃で10分処理した後、4℃で冷却した。PCR産物の塩基配列解析は、上述のプライマーを用いて(株) ファスマックシーケンスサービス (神奈川) に依頼して得た。酵母の種は、ITS領域およびβ-tubulin領域の塩基配列をBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) により相同性解析を行い、同定をした。

4) 酵母の顕微鏡観察

YPD平板培地上にコロニーを形成した各酵母について、常法に従ってプレパラートを作製し、光学

顕微鏡 (BX51, オリンパス (株), 東京) にて酵母の形態を観察した (拡大倍率 :200 倍)。

5) 製品中の酵母生菌数の算出方法

D, S, HN, それぞれ 0.1 g を滅菌水 1 mL に懸濁した。HL は、懸濁せずに 100 μ L 用い、10 倍希釈を 10 回繰り返して希釈液を作製した。各段階希釈液 100 μ L を YPD 平板培地で 30°C, 24 時間培養し、得られたコロニー数を計測した。

6) 酵母の増殖速度の測定

前培養として、YPD 平板培地上の分離菌株から一白金耳分を 50 mL の YPD 液体培地に接種し、30°C, 130 rpm で 12 時間振とう培養 (BioShaker BR-21FP, タイテック (株), 埼玉) を行った。本培養においては、前培養の酵母培養物 5 mL を 50 mL の YPD 液体培地に移植し、前培養と同条件で振とう培養を行い、対数増殖期を経て定常期にいたるまで経時的測定を行った。分光光度計 (デジタルパックテスト・マルチ SP DPM-MTSP, (株) 共立理化学研究所, 神奈川) を用いて、 A_{600} における濁度を、30 分から 180 分までは 10 分ごと、180 分以降 390 分までは 30 分ごとに測定した。

7) 炭酸ガス発生量の測定

6) の結果から、生育菌数に有意差は認められなかった。しかし、前報¹⁵⁾において各酵母を使用した食パンの内相部は電子顕微鏡観察により、気泡の大きさに差がみられたことから、炭酸ガスの発生量の違いに着目した。

前培養として、YPD 平板培地上の分離菌株から一白金耳分を 50 mL の YPD 液体培地に接種し、30°C, 130 rpm で 12 時間振とう培養を行った。前培養の酵母培養物 5 mL を 50 mL の YPD 液体培地に移植し、再び前培養と同条件で振とう培養を行い、 $A_{600}=0.80$ (対数増殖期) になったものを接種菌液とした。接種菌液 10 mL を新しい YPD 液体培地 100 mL に移植し、前培養と同じ条件で振とう培養を開始して酵母の発酵により発生した炭酸ガス量を 10 分ごと 580 分まで測定した。

炭酸ガス発生量の測定は、イースト工業会法²³⁾、松本ら²⁴⁾の方法に準じて行った。培養液を 500 mL ペットボトルに入れて密閉し、発生した炭酸ガス

をペットボトルに装着したシリンジ (注射針 NN-2038R, テルモ (株), 東京) とプラスチックチューブ (FLEXIBLE PLASTIC TUBING, 外径 4.5 mm, 内径 1.5 mm, サンゴバン (株), 東京) を通じて、水で満たした 50 mL ビュレットに送り込み、ガス圧によって押し出された液量を読み取って記録した。培養液を入れたペットボトルは、恒温水槽 (PERSONAL-11, タイテック (株), 埼玉) を用いて、30°C, 130 rpm で往復振とうさせた。測定は 2 回を行い、平均値を求めた。

8) 製パン試験

①実験材料

D および S それぞれ 0.1 g を滅菌水 1 mL に懸濁した。HL は懸濁せずに用いた。これら 3 種の 100 μ L を YPD 平板培地にプレーティングし、30°C, 24 時間培養した。培養後、形成されたコロニーから直接菌体を集め、パンを調製した。5) で求めた製品 1 g あたりの酵母生菌数の結果から、パンの調製に必要な酵母生菌数を求め、酵母菌体重量を求めた。パンの調製に必要な酵母生菌数は S が 1.25×10^9 で 3 酵母のうち最も多かったため、D, HL の酵母生菌数を S の酵母生菌数に合わせ計量を行った。酵母以外の材料は、強力粉 (カメリヤ, (株) 日清製粉ウェルナ, 東京), 上白糖 (スプーン印, 三井製糖 (株), 東京), 塩 (食塩, (公財) 塩事業センター, 東京), スキムミルク (北海道スキムミルク, 雪印メグミルク (株), 東京), バター (北海道よつ葉バター食塩不使用, よつ葉乳業 (株), 北海道), 蒸留水を用いた。それぞれの酵母を用いたパン試料を D 試料, S 試料, H 試料とした。

②調製方法

パンの分量は、Table 1 に示すように、ホームベーカリー添付の取扱説明書掲載レシピ²⁵⁾に準じた。パンの調製は、ホームベーカリー (SD-BH1001, パナソニック (株), 東京) により、食パンコース (全工程 4 時間) とした。各操作の時間については、記載がないことにより、実際にホームベーカリーが動いている時間を測定した。その結果、食パンコースでは、1 回目のねり 20 分、ねかし 36 分、2 回目のねり 13 分、発酵 133 分、焼成 38 分という設定で行った。

Table 1 パンの配合 (g)

材 料	試 料		
	D	S	H
強力粉	250.0	250.0	250.0
酵母	7.2	5.0	5.2
上白糖	17.0	17.0	17.0
塩	5.0	5.0	5.0
スキムミルク	6.0	6.0	6.0
バター	10.0	10.0	10.0
蒸留水	180.0	180.0	180.0

g 単位を示す。酵母は単離により得られた生菌重量 (wet) を示す。

D:インスタントドライイースト, S: 白神こだま酵母, H: ホシノ天然酵母パン種を示す。

③測定方法

a. 体積, 重量, 比容積, 水分含有率

パンは焼成後, 室温 (25°C) にて1時間放冷し, 室温になった状態を確認後, 食品用ラップフィルムに包んだ後ジッパーつきポリエチレン袋に入れた状態で保存した。室温 (25°C) で12時間保存した試料の体積, 重量を, レーザー体積計 (Selnac-Win VM2100, 株式会社アステックス, 大阪) により測定した。比容積は, パンの体積を重量で除して求めた⁴⁾。

水分含有率は, 試料の内相部 5 g を用い, 赤外線水分計 (FD-600, 株式会社ケット科学研究所, 東京) により測定した。110°C, 80 分に設定し, 恒量に達したのを確認後, 水分含有率とした。試料は各3個調製し, 平均と標準偏差を求めた。

b. 食パンのテクスチャー

a. と同様に保存した試料の内相中央部より 2×2×2.5 (縦×横×高さ) cm の大きさに, 単回使用マイクロトーム用刃 (ライカマイクロトーム替刃 818, ライカマイクロシステムズ (株), 東京) を用いて切ったものを測定用試料とした。各試料のテクスチャーをレオメーター (RE2-33005C, 株式会社山電, 東京) により測定した。各試料から5個を切り出し, 3回焼成した試料の計15個を測定して, 平均と標準偏差を求めた。測定条件は, ロードセル 20 N, 円柱プランジャー直径 8 mm, 測定歪率 90%, 測定速度 10 mm/sec とした。

c. パンの組織観察

a. と同様の試料の内相中央部を, 単回使用ミクロ

トーム用刃 (ライカマイクロトーム替刃 818, ライカマイクロシステムズ (株), 東京) を用いて, 1×1×0.3 (縦×横×高さ) cm に切り出し, 卓上走査型電子顕微鏡 (Miniscope TM3030Plus, 株式会社日立ハイテク, 東京) で断面を40倍, 加速電圧 10 kV により観察した。気泡の長径および長短軸比は, 画像解析・計測ソフトウェア (WinLOOF2015, 三谷商事 (株), 東京) で計測した。なお, 気泡の長短軸比は, 縦の長さ/横の長さで求めた。

(3) 統計処理

各測定データは, 平均値±標準偏差を求め, IBM SPSS Statistics Ver.24 を用い, 試料を要因とした一元配置分散分析を行った。有意差があった場合には, Tukey の多重比較を行った。有意水準は 5% ($p < 0.05$) とした。

3. 実験結果

(1) 分離した酵母菌株

2. (2) 2) で単離した酵母の YPD 平板培地上での各コロニーから, 新 YPD 平板培地に植菌し, 純粋分離株を得た。

(2) 酵母の同定

リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域および β -tubulin 領域の PCR 産物の塩基配列解析から得られた3株の配列は, 100% 同一であった。BLAST によるの相同性検索の結果, いずれも登録されている *Saccharomyces cerevisiae* の配列と 100% 同一であり, その結果本研究で用いる3種は *S. cerevisiae* と同定された (data not shown)。

(3) 酵母の形態

酵母3種の細胞観察の結果を Fig.1 に示した。D は長楕円形で, S および H は円形に近い楕円形を示していた。H は D, S に比べやや小さいものであった。

(4) 製品中の酵母生菌数の算出

YPD 平板培地で得られたコロニー数を計測し, 製品 1 g あたりの酵母生菌数を求めた。その結果, D は 1.72×10^8 CFU/g, S は 2.49×10^8 CFU/g, HN は 2.40×10^4 CFU/g, HL は 2.06×10^6 CFU/g であった。HN は製品内に小麦粉, 米, 麴を含んでいるため,

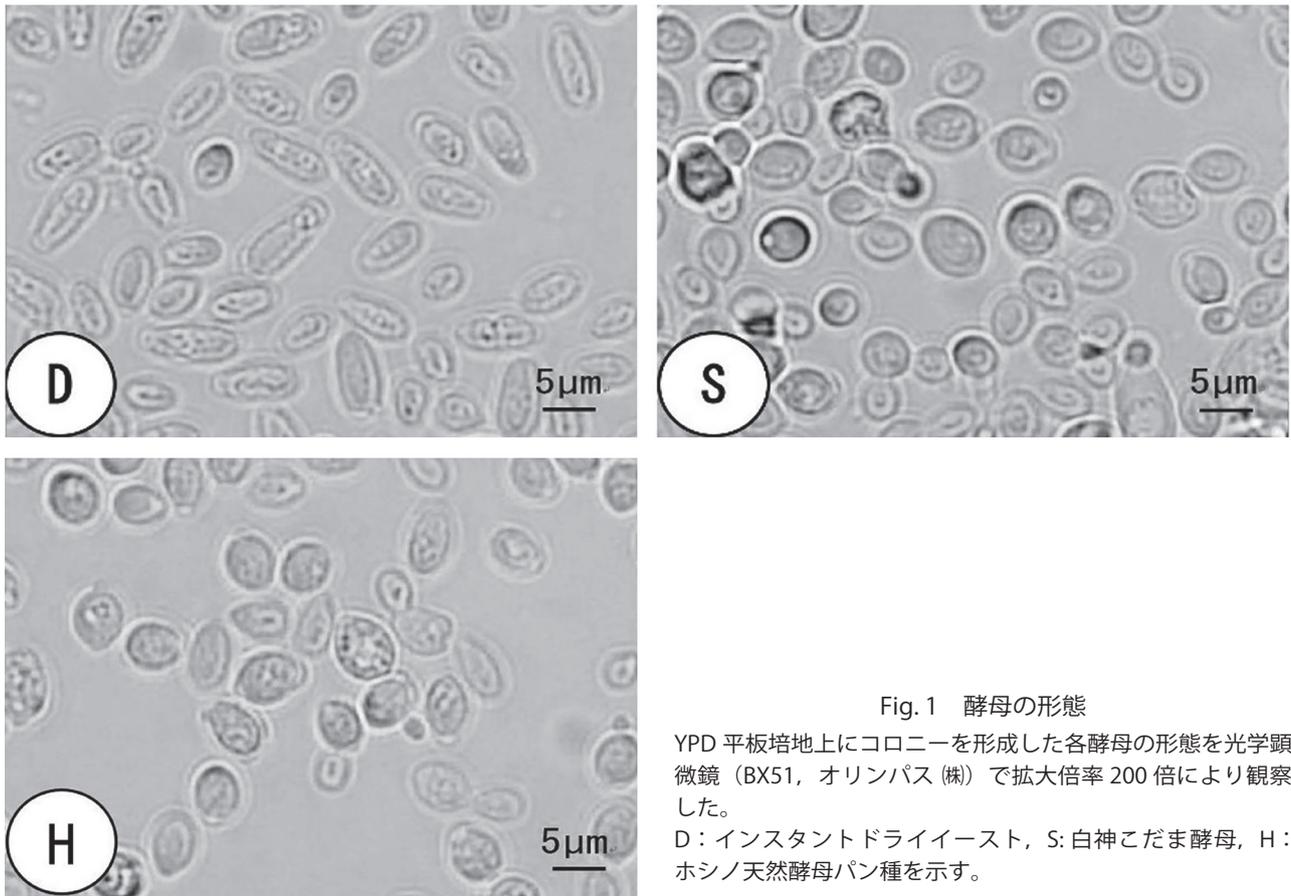


Fig. 1 酵母の形態

YPD 平板培地上にコロニーを形成した各酵母の形態を光学顕微鏡 (BX51, オリンパス (株)) で拡大倍率 200 倍により観察した。

D: インスタントドライイースト, S: 白神こだま酵母, H: ホシノ天然酵母パン種を示す。

D, S に比べ同重量に入っていた酵母生菌数が約 1/10000 と少なかった。HN は 28°C, 24 時間の生種起こしを行うことによって, HL の生菌数が約 100 倍に増えていた。しかし, D, S と比較すると非常に少なかった。このことは, H は発酵に時間がかかる⁶⁾とされていることを裏付ける結果であった。

(5) 酵母の増殖速度の測定

酵母の生育を, その菌数をカウントすることで測定した。その結果, いずれの酵母も 300 分まで生育菌数の増加が認められ, 菌体量の増加がみられた。3 種の酵母の生育数には差が認められなかったことから, 各酵母の増殖速度に大きな違いはなかった。

(6) 炭酸ガス発生量

炭酸ガス発生量を測定した。その結果, 170 分までは各酵母における炭酸ガス発生量はほぼ

同じ値であった。しかし, 180 分以降から 490 分までの D と S は似た挙動を示したが, H は 460 分まで炭酸ガス発生速度が速かった。580 分間のトータル炭酸ガス発生量は D が最も多く, S と H は同等の値を示した (Fig.2)。

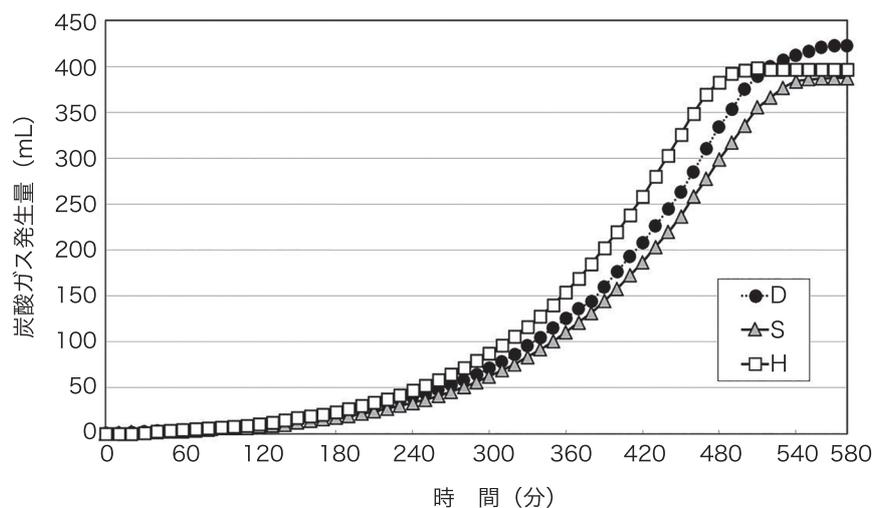
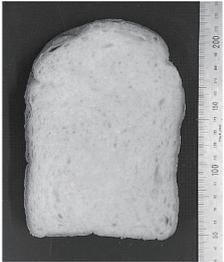
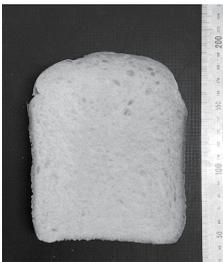


Fig. 2 酵母培地における炭酸ガス発生量

$A_{600}=0.80$ (対数増殖期) になるよう前培養した酵母菌液 10 mL を YPD 液体培地 100 mL に接種し, 30°C, 130 rpm で振とう培養を行った。炭酸ガス発生量を 10 分ごと 580 分間にわたり測定した。測定は 2 回行い, 値は平均値を示す。

D: インスタントドライイースト, S: 白神こだま酵母, H: ホシノ天然酵母パン種を示す。

Table 2 パンの断面, 体積, 重量, 比容積, 水分含有率

試料	D	S	H
断面			
体積 (cm ³)	1763.8 ± 87.9	1653.4 ± 18.0	1684.2 ± 36.0
重量 (g)	410.7 ± 0.7	412.3 ± 3.2	412.3 ± 1.0
比容積 (cm ³ /g)	4.29 ± 0.22	4.01 ± 0.07	4.09 ± 0.08
水分含有率 (%)	47.0 ± 0.3 ^a	46.0 ± 0.2 ^b	46.3 ± 0.3 ^{ab}

$n=3$ で行い, 値は平均値±標準偏差を示す。また, a,b は各測定項目間において異符号間に有意な差があることを示し ($p < 0.05$), 符号なしは各測定項目間において各試料間に有意な差がないことを示す。

D: インスタントドライイースト, S: 白神こだま酵母, H: ホシノ天然酵母パン種を示す。

(7) 製パン試験

① パンの断面の観察, 体積, 重量, 比容積および水分含有率

単離した酵母を用いて調製したパンの断面像, 体積, 重量, 比容積および水分含有率を示した (Table 2)。

パンの断面をみると, D 試料の気泡が大きく, S 試料は内相の中央部に小さな気泡が比較的詰まっていた。H 試料は縦長の気泡が不均一に点在していた。体積, 重量, 比容積では, 3 試料間に有意差はなかった。水分含有率では S 試料がやや低い値を示した ($p < 0.05$)。 (6) の測定結果から, 180 分以降 460 分まで H の炭酸ガス発生量が D, S よりも多かったが, パンの調製で用いた機器では発酵時間が 133 分であったため, パンの膨化には大きな影響をおよぼさず, 体積, 重量, 比容積に有意差がでなかったものと考えられる。

② パンのテクスチャー

単離した酵母を用いて調製したパンのかたさ, 凝集性, 付着性を示した (Table 3)。

かたさでは, S 試料が高く, D 試料が低い値であった。H 試料は中間の値を示し, D 試料, S 試料と有意差はなかった。凝集性, 付着性では, 3 試料間に有意差はみられなかった。

D 製品に含まれるビタミン C および乳化剤, H 製品に含まれる小麦粉, 米, 麴がパンの品質におよぼす影響を排除するために, 単離した酵母を用いてパンを調製したが, かたさにおいて酵母の性質により各パンの品質が影響を受けたものと推察された。

③ パンの組織観察

単離した酵母を用いて調製したパンの組織構造を示した (Fig.3)。D 試料では, 気泡 (ac) が大きく, 気泡を囲むグルテンネットワークがしっかりと連続

Table 3 パンのかたさ, 凝集性, 付着性

試料	D	S	H
かたさ ($\times 10^5$ Pa)	1.24 ± 0.17 ^b	1.74 ± 0.30 ^a	1.44 ± 0.29 ^{ab}
凝集性	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.12	0.60 ± 0.08
付着性 ($\times 10^2$ J/m ³)	1.57 ± 0.76	2.02 ± 0.79	2.52 ± 0.08

$n=15$ で行い, 値は平均値±標準偏差を示す。また, a,b は各測定項目間において異符号間に有意な差があることを示し ($p < 0.05$), 符号なしは各測定項目間において各試料間に有意な差がないことを示す。

D: インスタントドライイースト, S: 白神こだま酵母, H: ホシノ天然酵母パン種を示す。

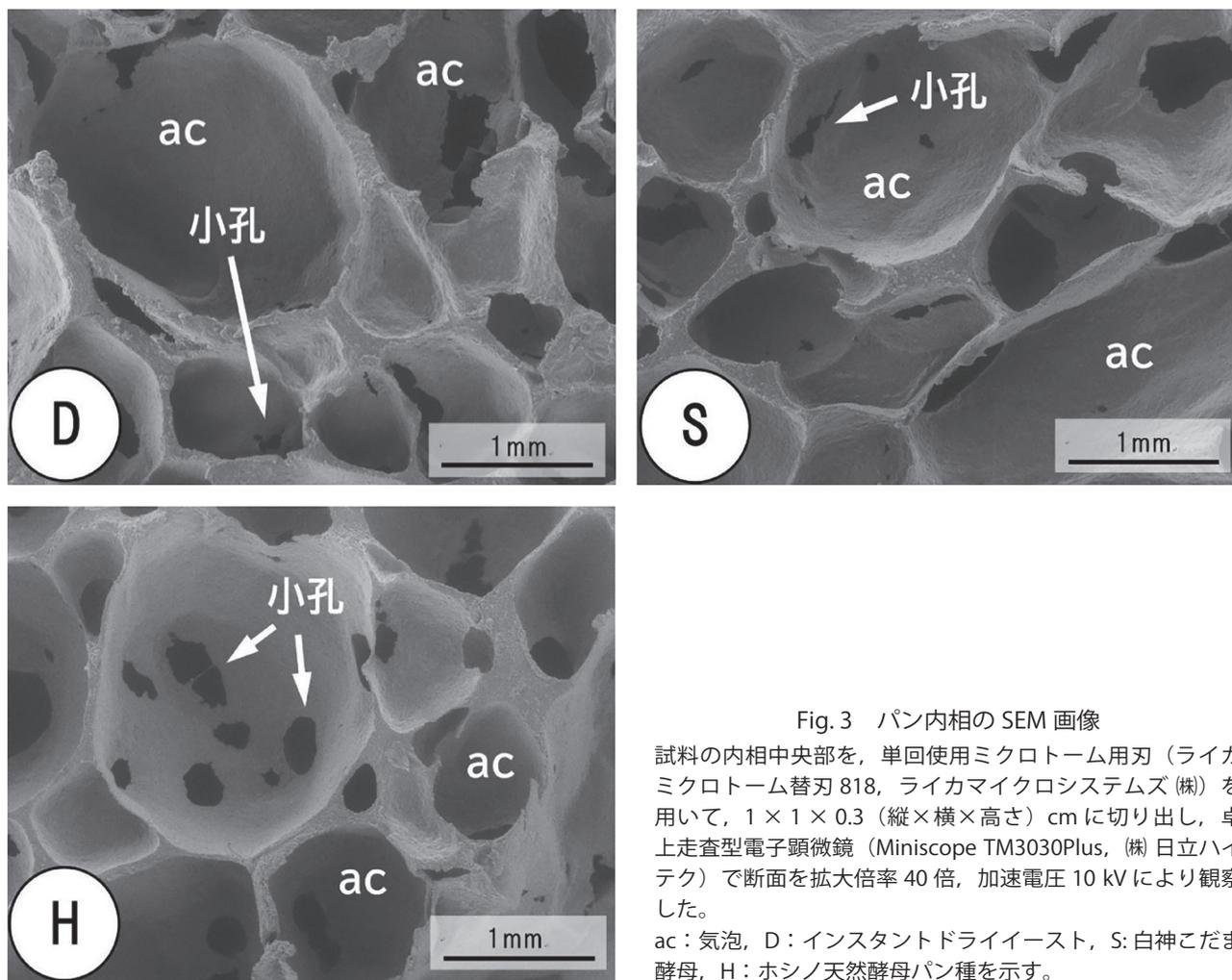


Fig. 3 パン内相のSEM画像

試料の内相中央部を、単回使用マイクローム用刃（ライカマイクローム替刃 818, ライカマイクロシステムズ (株)）を用いて、1 × 1 × 0.3（縦×横×高さ）cm に切り出し、卓上走査型電子顕微鏡（Miniscope TM3030Plus, (株) 日立ハイテク）で断面を拡大倍率 40 倍、加速電圧 10 kV により観察した。

ac：気泡，D：インスタントドライイースト，S：白神こだま酵母，H：ホシノ天然酵母パン種を示す。

して形成されていた。S 試料は、D 試料および H 試料に比べ気泡がやや小さかった。H 試料は、気泡が大きく、また、D 試料および S 試料に比べ気泡膜が薄く、小孔が多く確認できた。

各試料の気泡の長径を測定した結果、D 試料が 1.13 ± 0.60 mm, S 試料が 0.99 ± 0.37 mm, H 試料が 1.08 ± 0.60 mm であった。D 試料 > H 試料 > S 試料の順で気泡が大きかったが有意差はなかった。気泡の長短軸比をみると、H 試料が 1.48 ± 0.43 で有意に最も大きく、3 試料のうちで気泡が縦に最もよく伸びていたことを示していた。木村らの報告では、スポンジケーキにおいて焼成後の放冷において気孔（本研究でいうところの気泡）内の気体が収縮するのに伴って壁に小孔が開くことにより、外気が流入し、気孔壁の崩れをまぬがれた²⁶⁾とされている。H 試料においても、小孔によって気泡が焼成時に縦長に膨張したまま、放冷後も縦長の形状が保たれたと推察された。

4. 考察

D は製品内に酵母の他ビタミン C, 乳化剤を含み、H は小麦粉、米、麴を含んでいる。このことから、酵母以外の材料の影響を排除するため、酵母の単離を行ってその後の製パン試験に用いた。単離した酵母の同定のために、リボゾーム RNA 遺伝子の ITS 領域および β -tubulin 領域を PCR 反応にて増幅し塩基配列解析を行った。決定された 3 株の配列は同一であり、BLAST の相同性検索の結果、いずれも *S. cerevisiae* と同定された。

また、H は発酵に時間が長くかかる⁶⁾とされていることから、製品 1 g あたりの酵母生菌数が D および S よりも少ないことが予想された。限界希釈法によって酵母生菌数を算出した結果、D は 1.72×10^8 CFU/g, S は 2.49×10^8 CFU/g, HN は 2.40×10^4 CFU/g, HL は 2.06×10^6 CFU/g で、HN の酵母生菌数は D および S と比較して約 1/10000 と少なかった。

このことから、H を用いて D および S と同等の体積のパンを調製するためには発酵時間が D およ

びSよりも長く必要であることが明らかになった。この結果は、Hを用いたパンの調製には時間がかかる⁷⁾とされていることを裏付けるものとなった。

次に、酵母の増殖速度を、その菌数をカウントすることで経時的に測定した。その結果から、3種の酵母の生育数には差が認められず、各酵母の増殖速度に大きな違いはなかった。

その後、同一生菌数における発酵時の炭酸ガスの発生量を測定した。その結果、170分までは、各酵母における炭酸ガス発生量に違いはなかったが、180分以降から460分までHはDおよびSに比べて炭酸ガス発生速度が速く、発生量が多かったことから、各酵母の発酵能に違いがあることが明らかになった。

製パン試験では、かたさにおいてD試料が最もやわらかかった。組織観察において、D試料では、気泡が大きく、気泡を囲むグルテンネットワークがしっかりと連続して形成されていた。このことから、D試料のガス保持性が高くなり、やわらかくなったものと推察された。また、H試料の気泡膜に多くの小孔が生じていた。同一製品重量を用いた山田らの報告¹⁵⁾においても、H製品で調製したパンの気泡膜に多くの小孔の存在を確認している。Hは材料に麴を含むため、麴由来のプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素群などがグルテンのペプチド鎖を切断し²⁷⁻³⁰⁾、グルテンネットワークが形成され難く、気泡膜に小孔が生じたものと推察していた。しかし、単離酵母を単独で用いた本製パン試験においても、小孔の発生が明らかになったことから、麴由来の分解酵素群のみならず、酵母由来の分解酵素群³¹⁻³³⁾も関与しているのであろうと推察できる。そのような要因によって、H試料は麴と酵母由来の分解酵素群等の相乗効果により、D試料およびS試料よりも小孔が大きく、発酵や物性に違いが生じていたと考えられた。

先行研究により、酵母がアルコール発酵をする過程は、細胞内に取りこまれた糖(1分子のブドウ糖)が代謝されて、最終的に2分子のアルコールが生成されるということで説明されている。しかし、実際には単純な反応系ではなく、11の酵素が関与する代謝系である³²⁾ことが明らかにされている。酵母の発酵力を左右しているのは各反応に関与する酵素であり、11の酵素を保持していることは共通して

いても、各酵素の強さ(活性)や量は菌株によって異なり、最終製品のパンの香りも違ってくる³²⁾。また、各酵素の関わる反応段階において、多くの反応促進因子あるいは阻害因子が存在しており、酵母の菌株によって、促進あるいは阻害物質の効果の現れる濃度は違っている。パン生地は小麦粉や他の原料副資材から成る様々な物質が混在した複雑な基質系であるため、単純な溶液系での実験結果とは異なり、酵母の解糖系への影響が拡大され、結果として発酵力に違い³³⁾が出るとされている。本研究において、酵母製品D、SおよびHに含まれる酵母はいずれも*S. cerevisiae*であるものの、炭酸ガス発生量に差があり、パンのかたさ、気泡の状態にも違いがみられた。*S. cerevisiae*株であっても、実用に用いられる酵母(実用酵母)と実験室酵母では、多くの細胞特性が明瞭に異なる³⁴⁾。今回の塩基配列解析領域は種の同定用の保存性の高い領域であり³⁵⁾、今後3種の特性の違いを見出すには網羅的な遺伝子群の発現解析およびタンパク質の機能解析が必要である。すなわち、3種の酵母による炭酸ガス発生量、パンのかたさ、気泡の状態の違いは、酵母の持つ約6000遺伝子の何らかの遺伝子配列の変異によるものなのか、遺伝子群の発現変動によるものなのかに関しては、今後より詳細な解析が必要である。

5. 結論

天然酵母パンに広く知られている酵母として、白神こだま酵母、ホシノ天然酵母パン種がある。インスタントドライイーストは製品内に酵母の他ビタミンC、乳化剤を含み、ホシノ天然酵母パン種は小麦粉、米、麴を含んでいることから、それらの酵母以外の物質による影響を排除するため、酵母の単離を行った。リボゾームRNA遺伝子のITS領域および β -tubulin領域をPCR反応にて増幅し、シーケンス解析による塩基配列を明らかにし、BLASTによる同源性検索を行ったところ、いずれの酵母も*S. cerevisiae*であることが同定できた。その後、それぞれの酵母の形態を顕微鏡観察すると、形状および大きさに違いがあった。また、限界希釈法によって製品1gあたりの酵母生菌数を算出したところ、白神こだま酵母はインスタントドライイーストと同等の酵母生菌数があった。いっぽう、ホシノ天然酵母パン種の製品1gあたりの酵母生菌数はイン

スタントドライイーストおよび白神こだま酵母に比べ1/10000と少なかった。酵母の増殖速度では3種の酵母間で大きな違いはなかったが、炭酸ガス発生速度では460分までホシノ天然酵母パン種が早かった。トータル炭酸ガス発生量ではインスタントドライイーストが最も多く、白神こだま酵母とホシノ天然酵母パン種は同等の値を示し、炭酸ガス発生能に違いがあることが示唆された。

製パン試験では、体積、重量、比容積では3試料間で差はなく、かたさにおいてインスタントドライイースト試料が最もやわらかく、白神こだま酵母試料が最もかたくなり、ホシノ天然酵母パン種試料は中間の値を示した。

気泡の大きさでは、3試料間に有意差はみられなかった。前報¹⁵⁾において、同一製品重量を用いたインスタントドライイースト試料の気泡が有意に大きく、白神こだま酵母試料とホシノ天然酵母パン種試料間に差はなかった。各単離酵母における炭酸ガス発生量の測定結果から、パンの調製に用いた機器の発酵時間においては、各酵母の炭酸ガス発生量に大きな違いがなかった。そのため、同一生菌数を用いた本試験においては気泡の大きさに有意差がでな

かったものと推察される。

このことから、ホシノ天然酵母パン種による製パンは発酵時間が長くなるかとされているが、インスタントドライイースト、白神こだま酵母と同等の酵母生菌数を用いることで、より短時間で品質が劣らないパンづくりが可能であることが明らかになった。また、白神こだま酵母は種起こしが不要^{9,14)}であるにもかかわらず製品内にインスタントドライイーストと同等の酵母生菌数があり、同じ発酵時間で膨化のかわらないパンができることが示された。

いずれの酵母も *S. cerevisiae* であったが、酵母の持つ約6000遺伝子の何らかの遺伝子配列の変異なのか、遺伝子の発現変動によるものなのかは未解明だが、酵母種によって炭酸ガス発生量、パンのかたさ、気泡の状態の違いが生じたと推察される。前報¹⁵⁾において製品のホシノ天然酵母パン種を用いて調製したパンでは、やわらかく、凝集性が低く、官能評価では甘味があり、香りおよび総合評価において好まれていた¹⁵⁾。今後は、網羅的な遺伝子解析による発現遺伝子群の違いを把握することにより、特徴のある酵母種を用いたパンの開発につながると考える。

文 献

1. 原田昌博：発酵種の中の穀粉と微生物の複雑な関係 その1. *Pain* **64**(12): 4-10, 2017.
2. (一社) 日本パン技術研究所 おいしいパンの百科事典 健康志向のパン, <https://www.panpedia.jp/healthy/#healthy-3> 閲覧日 2022/5/19
3. Loponen, J., Gänzle, M.G.: Use of Sourdough in Low FODMAP Baking. *Foods*, 2018.
4. 竹谷光司：新しい製パン基礎知識 再改訂版. 東京, パンニュース社, 52-270, 2009.
5. 阿古真理：なぜ日本のフランスパンは世界一になったのか. 東京, NHK 出版, 26-95, 2016.
6. 井上好文：ホシノ天然酵母パン種に関する研究レポート. 製パン技術資料 **815**: 1-22, 2015.
7. (有) ホシノ天然酵母パン種：おいしいパンづくりのサポート ホシノ天然酵母パン種 使用マニュアル. 東京, (有) ホシノ天然酵母パン種, 2006.
8. 井上好文：天然酵母表示問題に関する見解. 製パン技術資料 **660**: 3-4, 2007.
9. 大塚せつ子：白神こだま酵母でパンを焼く. 東京, 農山漁村文化協会, 4-79, 2002.
10. 熊谷昌則, 高橋慶太郎, 高橋砂織：白神こだま酵母の学校給食用パンへの利用. 秋田県総合食品研究所報告 **3**: 57-63, 2001.
11. 熊谷昌則, 高橋慶太郎, 高橋砂織：学校給食用白神パンの品質に関する研究 白神こだま酵母の学校給食用パンへの利用 第2報. 秋田県総合食品研究所報告 **4**: 62-65, 2002.
12. 井上好文：ホシノ天然酵母パン種に関する研究レポート 2. 製パン技術資料 **828**: 1-31, 2016.
13. 下坂智恵：白神こだま酵母パン生地のにね上げ温度に関する研究. 大妻女子大学家政系研究紀要 **47**: 99-103, 2011.
14. 下坂智恵：白神こだま酵母を用いたパンの調製と膨化に関する研究. 日本調理科学会誌 **44**(3): 223-230, 2011.
15. 山田密穂, 小泉昌子, 赤石記子, 峯木真知子：酵母の違いがパンの品質に与える影響. 日本家政学会誌 **72**(12): 796-807, 2021.
16. 秋田十條化成(株)：白神こだま酵母ドライ原材料仕様書. 秋田, 秋田十條化成(株), 2017.
17. (有) ホシノ天然酵母パン種：ホシノ天然酵母パン種製品規格書. 東京, (有) ホシノ天然酵母パン種, 2019.
18. (株) 日清製粉ウェルナ：日清スーパーカメライースト製品パッケージ. 東京, (株) 日清製粉ウェルナ, 2021.
19. 後藤慶一：DNA塩基配列を用いたカビ・酵母の同定. *モダンメディア* **55**(9): 237-242, 2009.
20. 杉田隆, 高島昌子：病原性酵母の分類と同定における最近の動向. *Medical Mycology Journal* **52**(2): 107-115, 2011.
21. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols, a guide to methods and applications. California, Academic Press, 315-322, 1990.
22. Glass, N.L., Donaldson, G.C.: Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4): 1323-1330, 1995.
23. 日本イースト工業会：パン用酵母試験法. 東京, 日本イースト工業会, 5-7, 1996.
24. 松本博, 田中康夫, 吉田巖, 高野博幸, 岡田早苗：第4章 パン生地の醗酵. 製パンプロセスの科学. 田中康夫, 松本博, 東京, 光琳, 99-166, 1991.
25. パナソニック(株)：ホームベーカリー(家庭用)品番SD-BH1001(1斤タイプ)取扱説明書. 東京, パナソニック(株), 10-21, 2015.
26. 木村利昭, 藤井淑子, 和田淑子：第3章 小麦粉製品. 食品・調理・加工の組織学. 東京, 学窓社, 21-48, 1999.
27. 赤石(喜多)記子, 五月女まりえ, 小林愛美, 山下美恵, 長尾慶子：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**(2): 153-162, 2011.
28. 光永俊郎：小麦のプロテアーゼについて. 食物学会誌 **40**: 12-26, 1985.
29. 佐藤友太郎, 岡田経子, 渡辺修：製パンにおけるプロテアーゼの利用に関する研究 第1報. 日本食品工業学会誌 **9**(8): 326-331, 1962.
30. 林力丸：酵母のプロテアーゼに関する最近の研究. 日本醸造協会雑誌 **72**(5): 338-343, 1977.
31. オリエンタル酵母工業：パン酵母. 製パン技術資料 **398**: 4-16, 2015.
32. 安藤正康：パン生地における微生物のはたらき パン酵母を中心に 25. *Pain* **49**(2): 40-43, 2002.
33. 安藤正康：パン生地における微生物のはたらき パン酵母を中心に 26. *Pain* **49**(3): 41-43, 2002.
34. 島純：酵母の乾燥ストレス耐性 ポストゲノム手法によるアプローチ. 日本醸造協会誌 **105**(1): 16-21, 2010.
35. 蟻川幸彦, 戸井田仁一, 近藤君夫, 小松良寿, 藤田篤, et al.: リボゾーマル RNA 遺伝子介在配列 (ITS1, ITS2) を利用した酵母の同定. 長野県食品工業試験場研究報告 **32**: 47-51, 2004.