

研究論文

自然界から分離した酵母の培養・保持方法の検討

瀬見井純*¹Studies on the Culture and Preservation Method of Yeasts
Isolated from Natural SourceAtsushi SEMII*¹Food Research Center*¹

著者らはこれまでに、花卉から分離した酵母がパン製造へ利用できることを確認している。そこで本研究では、この分離酵母をパン製造現場で培養・保持するための方法について検討した。製造現場でも容易に取得可能な原材料を用いて培地を調製し、分離酵母を培養したところ、酵母数は良好に増加した。また、この酵母培養液を用いて中種法にてパンを試作したところ、生地を十分に膨張させることができた。

1. はじめに

近年、消費者は「天然」や「自然」をコンセプトとした食品に対し、好意的な印象を持つ傾向にある。パンの市場においてもその傾向は同様であり、その一例として、発酵種を用いたパンが挙げられる。発酵種とは、穀物や果物などを媒体に、そこに付着している微生物を増殖させたものであり、パン製造では生地を発酵させる際に使用される。この発酵種中には、酵母や乳酸菌など複数の微生物が共存しており、発酵時にそれらが生成する代謝産物によって生地の膨張や、独特な風味の付与が生じる。そのため、発酵種中に雑菌が混入すると、菌叢が変化し最終製品であるパンの品質に影響を及ぼす可能性がある。よって、発酵種を用いたパンの品質を保つには、発酵種中に存在する微生物群の生育を保持しつつ、外部からの雑菌の混入を抑制する必要がある、その管理にはかなりの労力がかかる。一方、一般的な酒やパンなどの食品製造では、単一株の酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が長い年月に渡り利用されてきた。単一株の *S. cerevisiae* は、菌叢の不明確な発酵種よりも扱い易いだけでなく、食経験が豊かで安全・安心な食品素材である。そこで、自然界から単一株の *S. cerevisiae* を分離しパン製造へ利用することができれば、「自然」をコンセプトとした製品が、発酵種使用時よりも容易に製造できるようになる。ただしその際に、分離した酵母は、地産地消の観点から分離源と同じ地域に所在する中小企業での利用が多くなると想定される。そのため、比較的少量の分離酵母を定期的に生産・供給する必要がある。しかし現状では、このような供給方法を酵母製造企業で実施することは難しい。

よって著者らは、従来の発酵種とは異なり、自然界から分離した単一株の酵母を、雑菌による汚染の危険性が少なく、より簡易に管理できる方法を提示することを目的に研究を行っている。これまでに自然界から複数の酵母を分離し、パン製造への利用適性について検討してきた¹⁾²⁾。そこで本研究では、パン製造者が自社で実施可能な分離酵母の培養・保持方法の検討を行った。

2. 実験方法

2.1 使用酵母

食品工業技術センターが保有する、庄内緑地のカキツバタより分離された酵母を用いた。培養には、YPD培地(2%グルコース、2%ハイポリペプトン、1%酵母エキス)を用い、30℃で所定時間振とう培養した。圧搾酵母は、培養液を遠心分離後、ろ紙ろ過により取得した。

2.2 酵母の特性試験

2.2.1 耐糖性試験

YPD培地にて前培養した酵母培養液を、スクロース濃度 2、10、20、30、40、50%となるよう調製したYPD培地に、波長 600nmでの濁度(OD₆₀₀)が 0.05となるよう添加した。この培養液を 25℃で 168 時間静置培養し、培養期間中、経時的に濁度を測定した。

2.2.2 アルコール耐性試験

YPD培地にて前培養した酵母培養液を、エタノール濃度 10、15、20%となるよう調製したYPD培地に、OD₆₀₀が 0.05となるよう添加した。この培養液を 25℃で 192 時間静置培養し、培養期間中、経時的に濁度を測定した。

2.3 分離酵母用培地の検討

*¹食品工業技術センター 分析加工技術室

2.3.1 エタノール濃度の検討

16%スクロース、5%モルトエキス溶液に、エタノールを 0、2.5、5、10%となるよう添加した培地を用いた。モルトエキスは添加前に沸騰湯浴中で 25 分間保持したものをを用いた。これらの培地に圧搾酵母を 0.02%添加し、25°Cで 3 日間静置培養した。経時的に培養液を採取し、酵母数を測定した。酵母数は、ポテトデキストロース寒天培地(0.01%クロラムフェニコール添加)を用いた混釈法により測定した。

2.3.2 モルトエキス濃度の検討

2.5%エタノール溶液に、モルトエキスを 5 又は 10%添加し、Brix が 20 となるようスクロースを加えた培地を用いた。これらの培地に圧搾酵母を 0.02%添加し、25°Cで 3 日間静置培養後、10°Cで 24 日間静置した。経時的に培養液を採取し、酵母数を測定した。

2.4 継代培養

酵母前培養液(12%スクロース、10%モルトエキス、2.5%エタノール、0.02%圧搾酵母)を 25°Cで 3 日間静置培養後、10°Cで 18 日間静置した。継代時に酵母前培養液のアルコール濃度、Brix を測定し、終濃度がアルコール 2.5%、Brix 20 となるよう調製した培地に、酵母前培養液を 10%添加した。25°Cで 3 日間静置培養後、10°Cで 32 日間静置し、経時的に酵母数、pH、アルコール濃度、Brix を測定した。アルコール濃度は、アルコメイト AL-2 型(理研計器株式会社製)にて測定した。

2.5 生地膨張力試験

シリンダー法³⁾にて実施した。2.4 節と同様に調製した酵母前培養液を、25°Cで 3 日間静置培養後、10°Cで 13 日間静置した。この前培養液を終濃度がアルコール 2.5%、Brix 20 となるよう調製した培地に添加した。これを 25°Cで 3 日間培養したものを酵母培養液とし、中種の調製に使用した。表 1 に示した原料配合で混捏した中種を 20、25、30°Cの各温度で 24 時間発酵させた。その後、中種と表 1 に示した本捏生地用の原材料を混捏し、シリンダーに詰めた。30°Cで静置し、継時的に生地頭頂部の高さを測定し、生地体積を算出した。各時間測定後の生地はガス抜きを行った後、再度シリンダーに詰めて試験を継続した。発酵前の生地体積に各測定時刻

表 1 原料配合 (生地膨張力試験)

	配合割合 (%)	
	中 種	本捏生地
小麦粉	70	30
酵母培養液	20	—
上白糖	5	5
食塩	—	2
水	22	23

における生地体積膨張量を累計し、その値を発酵前生地体積で除した値を生地膨張率とした。

2.6 製パン試験

2.5 節で使用した酵母前培養液を継代し、25°Cで 3 日間静置培養後、10°Cで 24 日間静置した。この前培養液を終濃度がアルコール 2.5%、Brix 20 となるよう調製した培地に添加した。これを 25°Cで 3 日間培養したものを酵母培養液とし、中種の調製に使用した。表 2 に示した原料配合で混捏した中種を 25°Cで 24 時間発酵させた。その後、中種と表 2 に示した本捏生地用の原材料を混捏し、30°Cで 60 分間発酵させた。ガス抜き、分割、成形を行った後、最終発酵は 38°C、85%RH のホイロ内で生地が型上 1cm になるまで行った。焼成条件は 200°C、25 分とした。焼成後のパンは、重量測定と菜種法による体積測定を行い、比容積を算出した。

表 2 原料配合 (製パン試験)

	配合割合 (%)	
	中 種	本捏生地
小麦粉	70	30
酵母培養液	20	—
上白糖	7	3
食塩	—	2
ショートニング	—	5
水	22	23

3. 実験結果及び考察

3.1 分離酵母の耐糖性とアルコール耐性

分離酵母用の培地組成を決めるため、酵母の耐糖性を評価した。分離酵母を添加した糖濃度の異なる YPD 培地について、経時的に濁度を測定した結果を図 1 に示す。20%スクロース添加 YPD 培地を用いたとき、酵母は最も良好に生育した。また、30%以上添加した培地を用いると、スクロース濃度の増加と共に酵母の生育が抑制される傾向が見られた。次に、雑菌の増殖抑制を目的としたエタノール添加濃度を設定するため、分離酵母のアルコール耐性を評価した。図 2 に示すように、10%エタノール添加培地では分離酵母は生育可能であったが、15%以上添加した YPD 培地中では生育できなかった。また、両試験結果から、分離酵母は培養開始 72 時間後に定常期に移行していることが確認された。以上より、分離酵母を培養する培地の組成はスクロース 20%、エタノール 10%以下とし、培養時間は 72 時間とした。

3.2 分離酵母の培養条件の検討

3.2.1 分離酵母用培地の検討

本研究で用いる分離酵母用培地は、パン製造現場での調製・使用を想定している。そのため培地の原材料には、容易に取得が可能な製パン材料で、窒素やミネラル

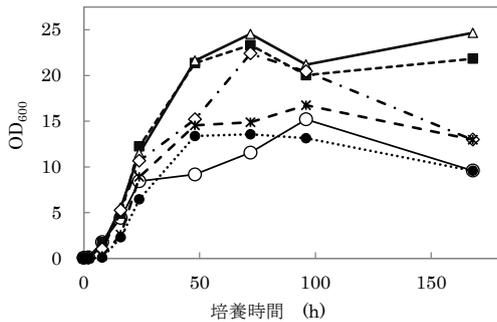


図1 糖濃度の異なる YPD 培地中での酵母増殖曲線
スクロース濃度：2%(○)、10%(■)、20%(△)、
30%(◇)、40%(*)、50%(●)

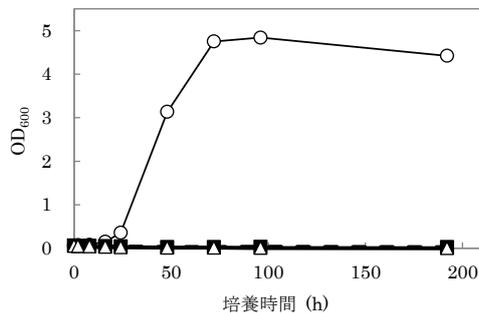


図2 アルコール濃度の異なる YPD 培地中での
酵母増殖曲線
エタノール濃度：10%(○)、15%(■)、20%(△)

を含むモルトエキスをを用いた。分離酵母の特性試験結果を基に、Brix 20 となるようモルトエキスとスクロースを加えた培地を用いて、分離酵母用培地へのエタノール添加量を検討した。その結果、図3に示すように10%エタノール添加培地では酵母数が減少したが、他の培地中では良好な増殖がみられた。この結果に加え、培養・保管中の酵母によるエタノール生成も考慮し、分離酵母用培地のエタノール濃度は2.5%とした。次に、モルトエキスの添加量について検討した結果を図4に示す。一定菌数の分離酵母を長期間保持することを想定し、酵母培養液を25℃で3日間培養後、10℃で保管し酵母数を測定した。25℃で3日間培養後の酵母数は、モルトエキスの添加量にかかわらずほぼ同等であったが、10℃で24日間静置した10%モルトエキス添加培地中の酵母数は、5%モルトエキス添加培地よりも若干高く 3.1×10^7 cfu/mLであった。また、25℃で3日間培養した培養液中のエタノール濃度は、10%モルトエキス添加培地の方が高く、Brixの低下も大きかった(結果は図示せず)。以上より、分離酵母用培地のモルトエキス添加量は、酵母の生育が良好な10%とした。

3.2.2 分離酵母の継代

前項で検討した培地を用いて分離酵母を継代した結果を図5に示す。25℃で3日間培養後、酵母数は $2.6 \times$

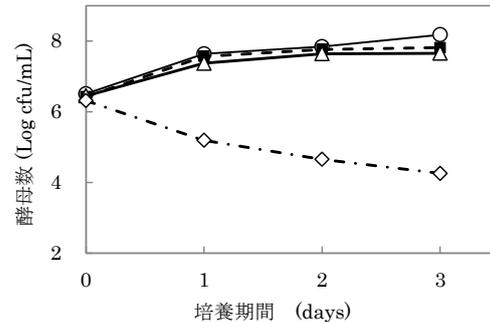


図3 アルコール濃度の異なる分離酵母用培地中の酵母数
エタノール濃度：0(○)、2.5%(■)、5%(△)、10%(◇)

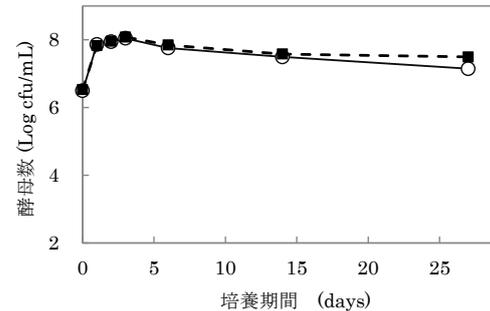


図4 モルトエキス濃度の異なる分離酵母用培地中の酵母数
モルトエキス濃度：5%(○)、10%(■)

10^8 cfu/mLとなり、良好に生育していることが確認された。その後、10℃で32日間(総試験日数35日)保持した際の酵母数は 2.7×10^7 cfu/mLであった。この数値は、継代時の酵母前培養液中の酵母数(1.3×10^7 cfu/mL)よりも高いことから、10℃で32日間保管後も十分な菌数が保持されていることがわかった。また、酵母培養液は、Brixの減少と共にアルコール濃度の上昇とpHの低下が見られた。25℃で3日間培養後にはアルコール濃度5.4%、pH4.1を示し、その後10℃で32日静置後にはアルコール濃度10.5%、pH3.9となった。この結果から、酵母培養液内は、混入が懸念される小麦粉由来の*Bacillus*属の増殖を抑制可能な環境になっていると考えられる^{4)~6)}。

3.3 分離酵母培養液を用いた生地膨張力試験

分離酵母用培地を用いた酵母培養液を使用し、生地膨張力試験を行った。中種法での生地膨張率を発酵温度で比較した結果を図6に示す。中種の発酵温度が20~30℃のどの試験区においても生地体積は増加した。発酵温度の上昇に伴い生地膨張率が増加する傾向が見られ、25、30℃の試験区の方が20℃の試験区よりも生地の膨張速度が大きかった。パンを製造する際、本捏生地の最終発酵は、発酵前生地体積の3~4倍膨らむよう発酵条件を調整する⁷⁾。今回の試験条件で生地膨張率が3以上

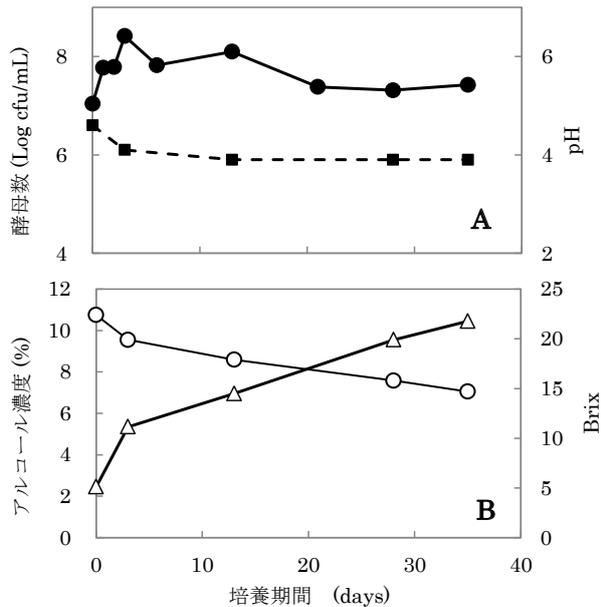


図5 継代後の酵母培養液中の成分変化
(A) 酵母数(●)、pH(■)
(B) アルコール濃度(△)、Brix(○)

になる発酵時間は、20℃の試験区で 320 分、25、30℃の試験区で 260 分であった。ただし、30℃の試験区では、若干ではあるが中種が過発酵の様相を呈していたため、中種は 25℃で発酵させることとした。

3.4 分離酵母培養液を用いた製パン試験

生地膨張力試験の結果をもとに、中種法にて製パン試験を行った。本製法では、一般的な中種法に比べ発酵時間が長いことから、中種の原材料のうち、酵母が資化する糖の配合比率を高く設定した。また、生地の伸展性を向上させ、パンの体積を増大させるため本捏生地にはショートニングを添加した。本試験では、最終発酵時、生地が型上 1.0cm になるまでに要した時間は 210 分であった。これは生地膨張力試験にて、生地膨張率が 3 以上になった時間とほぼ一致していた。焼成後のパンの比容積は 3.7cm³/g となり、一般的に好ましいとされている角型食パンの比容積 3.8~4.2cm³/g、山形食パンの比容積 4.0~4.5cm³/g⁸⁾ に比べ低い値を示した。よって今後は、生地の発酵条件等について試験を重ね、生地体積を増加させるための方法を検討していく。

4. 結び

カキツバタから分離した酵母の耐糖性について評価した結果、20%スクロース添加 YPD 培地で最も良好な生育を示した。アルコール耐性試験では、10%エタノール添加 YPD 培地で生育が確認され、それ以上の濃度では酵母の生育は見られなかった。10% モルトエキス、

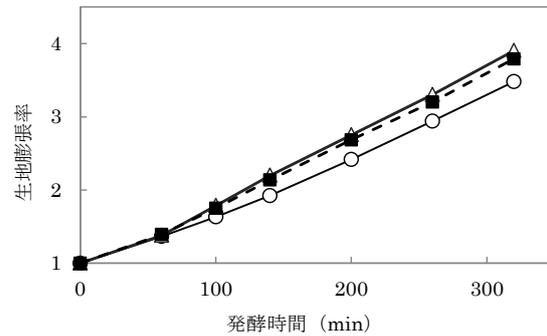


図6 発酵温度の異なる中種の生地膨張率
20℃(○)、25℃(■)、30℃(△)

2.5%エタノール、12%スクロース添加培地を用いて分離酵母を 25℃で 3 日間培養したところ、酵母数は 10⁸cfu/mL まで増加した。この酵母培養液は、10℃で 32 日間保管後も酵母数 10⁷cfu/mL を保っていた。酵母培養液を用いて調製した中種を 25℃で 24 時間発酵させた後、中種法にてパンを試作した結果、比容積は若干低かったが、パンを製造できることが確認された。以上より、本研究で定めた分離酵母用培地にて培養・保持された分離酵母が、パン製造へ利用できる可能性が示された。

付記

本研究は、公益財団法人エリザベス・アーノルド富士財団平成 27 年度学術研究助成により実施した。

文献

- 1) 安田(吉野)庄子, 北本則行: 日本食品科学工学会誌, **58**, 433(2011)
- 2) 間瀬雅子, 瀬見井純, 幅靖志, 小野奈津子, 安田(吉野)庄子, 高村玲子, 中莖秀夫: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **2**, 72(2013)
- 3) 日本イースト工業会: パン用酵母試験法, **2**(1996)
- 4) 上田成子, 天野恵里子, 門田ちはる, 藤間基朱, 槇野瑞枝, 吉沢美和子, 桑原祥浩: 日本食品工業学会誌, **27**, 453(1980)
- 5) 土戸哲明, 松岡英明, 小泉淳一, 高麗寛紀: 微生物制御 科学と工学, **P22**(2005), 講談社サイエンスフィク
- 6) 松田敏生: 食品微生物制御の化学, **P333**(1998), 幸書房
- 7) 竹谷光司: 新しい製パン基礎知識改訂版, **P140**(2005), パンニュース社
- 8) 田中康夫, 松本博編著: 製パンの科学(I)製パンプロセスの科学, **P4**(1992), 光琳