

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560032

研究課題名(和文) 高品質な米粉パン製造に最適な高ストレス耐性野生酵母の獲得と製パン技術開発

研究課題名(英文) Achievement of wild-type baker's yeast with tolerance to stress and the development of bread processing technology using rice flour

研究代表者

永井 毅 (NAGAI, Takeshi)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：10385502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：2-DG耐性酵母をセイヨウナシ(レッドバートレット)果実から単離し、28S rDNA部分塩基配列結果から、*S. cerevisiae*と同定した。生育適温は30℃、低糖下で良好に発酵した。-28℃下冷凍保存後では、高い発酵力を保持したが、凍結乾燥後では顕著に低下した。米粉による製パンではほとんど膨化しないかケービングしたが、20%グルテン添加と加水量調整により、膨化を可能とした。米粉中の水分量と最適加水量には負の相関が、米粉アミロース含量の増加に伴い、パン膨化率は減少した。以上、本酵母を用いて、米粉パン特有のクラストとクラムの触感、野生酵母特有の風味を兼ね備えた高品質な製パンを可能とした。

研究成果の概要(英文)：By the acquisition of 2-DG resistant mutants, carbon dioxide and ethyl alcohol production tests, and expandability power test of baking dough using wheat flour, a strain was isolated from pear cultivar Redbartillet fruit. It was identified as *S. cerevisiae* by the partial 28S rDNA sequence. The optimum growth temperature of the strain was 30℃ and it showed higher fermentation ability in the low-sugar dough. The ability retained under -28℃ preservation, but it extremely decreased in vacuum-packed strain after lyophilization. Using a mixture of rice flour and wheat gluten (8:2), and by the regulation of the appropriate water amounts, it makes it possible to produce high quality of rice bread having a characteristics crust and texture of rice bread and favorable flavor of wild-type yeast. It found that the appropriate water amounts were correlated to the water contents of rice flours. The expansion ratio of the bread decreased with an increasing amylose contents of rice flours.

研究分野：食品化学

キーワード：山形県産果樹果実 野生酵母 冷凍・乾燥耐性 米粉パン 製パン技術開発

1. 研究開始当初の背景

現代の日本人の食生活は、米より小麦（パンや麺類）を食する傾向が年々強くなっている。実際に1人あたりの米の年間消費量は、昭和37年の半分程度まで減少している。現在2世帯以上の家庭をみた場合の年間消費金額は、米が27,428円、パンが28,318円となっており、小麦を原料とするパン食が米食を上回っている。近年、日本の食料自給率（カロリーベース）は39%前後を推移し低迷しており、2020年の50%まで上昇させるとする国の目標値には到底及ばないのが現状である。食料の半分以上を諸外国からの輸入に頼っているわが国で、主食用米の自給率はほぼ100%と高い値を示しており、数少ない自給可能な食材のひとつとなっている。食料自給率上昇の面からも、米の消費量を上げることが緊急の課題である。平成21年7月「米穀の新用途への利用の促進に関する法律」が施行され、米粉用米の生産量は平成20年度の566トンから平成21年度の約13,000トンに増加し、米粉の利用拡大が進んでいる。小麦粉食品約7g（ロールパン1個の5分の1程度）を国産の米粉食品に代替することにより、食糧自給率は1%上昇すると試算される（2009年農林水産省「米粉の消費拡大」より）。従来米は米飯だけでなく、白玉粉や餅粉としてせんべいや団子の製造に利用されてきたが、現代の食生活で最も消費の期待されるパンへの取り組みも進んでいる。しかしながら、（1）小麦粉と異なりグルテンを形成しないこと、（2）米粉生地的气体発生量が多いが、ガス保持力が劣るため、発酵途中でガスが漏洩し焼成しても「かま落ち」が発生しボリュームが保持できないこと、（3）焼成後時間とともに固さが増すことなどの性質から、小麦粉を使用した高品質なパンと比較した場合問題点も多い。これらの問題を克服するためには、冷凍耐性、乾燥耐性、浸透圧耐性に富み、発酵特性や芳香性に優れた野生酵母の獲得が必要不可欠である。その一方で、野生酵母は、（1）種起こしに手間を要すること、（2）冷凍・乾燥耐性（安定性）や膨張力が劣ることなどの問題が指摘されている。

2. 研究の目的

米の消費が低迷する一方で、小麦製品、特にパンの消費量は年々増加している。わが国の食料自給率は昭和40年（カロリーベース73%）以降低下の一途を辿り、平成23年では39%まで低下した。平成9年度（同41%）から現在までほぼ横ばいとなっており、主要先進10カ国では最低水準にある。パンは現在日本人の食生活においてなくてはならない加工食品のひとつとなったが、仮にパン食を基本とする食生活を続けた場合、数少ない自給可能な米の消費が伸び悩むことは明らかである。近年、米の消費拡大に向けて米粉を用いたパンの開発も進んでいるものの、小麦を用いたパンと比較した場合品質面での問題点も多

く普及が限られている。本研究では「高品質な米粉パン製造に最適な高ストレス耐性野生酵母の獲得」と、「米の品種別製パン技術開発」を目的とした。

3. 研究の方法

（1）野生酵母の分離

本学園場で栽培した果樹果実5種「オウトウ、セイヨウナシ、カキ、ブドウ、リンゴ」21品種より採取した。乳鉢で摩砕後、バイアル瓶に入れ、30-2日間前培養した。得られた培養液は、YPDプレートに播種し、30-2日間培養した後コロニーを分離し、純培養とした。

（2）野生酵母の選抜

分離したコロニーは、顕微鏡用デジタル画像システム220F-HD搭載の生物顕微鏡[ケニス（株）製、JT0-1500T]を用いて検鏡し、形態観察から酵母を選抜した。また、得られたコロニーの識別を目的として、Hückerの変法を用いてグラム染色した。¹⁾最終選抜酵母は、28S rDNA部分塩基配列を検討し、酵母の同定を行った。

（3）マルトース資化株の獲得

自然界から分離する酵母の多くはマルトース発酵力が乏しいという欠点がある。マルトースを糖源として十分な発酵力が得られる酵母育種を目的として、2-デオキシグルコース（2-DG）耐性株を取得するために2-DG含有YNB-Mプレートに塗布し、マルトース資化酵母のみを選抜した。²⁾また、2-DG濃度を0.02-0.06%に段階的に上昇させることで、2-DG耐性株を取得した。本寒天培地上では、グルコースリプレッションを受ける野生株は生育しないが、グルコースリプレッションが解除され、マルトース資化酵母は生育できるため、効率良く目的酵母を選抜できた。

（4）1次スクリーニング（二酸化炭素発生力試験）

二酸化炭素発生力試験は、木下と田中の方法³⁾に準じて行った。獲得した2-DG耐性株はYM液体培地に播種し、30-24時間前培養した。これを予めDurham管を逆向きに投入、滅菌した5%スクロース溶液に加えて30で培養し、気体発生の様子を観察した。対照として、市販ドライイーストを用いて同様に観察した。

（5）2次スクリーニング

糖類によるエタノール生成力試験

滅菌したグルコース、フルクトース、マルトース添加酵母液を30で培養し、エタノール濃度を経時的に測定した。

生育適温試験ならびに形態的特徴観察

各種糖質添加酵母培養液を20-35で3日間培養し、生育適温を検討するとともに、ブ

プレートに培養したコロニーの形状、色調、細胞形状や細胞の大きさなどを観察した。

生地膨張力試験

生地膨張力試験は、日本イースト工業界のパン用酵母試験法⁴⁾を改変して実施した。糖添加条件を、無糖、低糖、高糖に設定し、自動ホームベーカリー（パナソニック製、SD-BMS106型）を用いて生地を調製した。これをシリンダーに入れ、30℃で発酵させながら生地の容量を測定した。

冷凍・乾燥耐性試験

YPDプレートにて継代培養中の選抜酵母をYPD液体培地に播種し、30℃-48時間振盪培養した。遠心分離（8,000回転-10分間-20℃）により回収した酵母を-28℃に冷凍し、冷凍耐性試験に供した。一方、遠心分離後の酵母は、アズワン（株）製凍結乾燥機（FDU-12AS型）を用いて凍結乾燥した。これを真空包装し、-20℃、4℃、15℃および30℃保存下において乾燥耐性試験を行った。

（6）3次スクリーニング（製パン試験）

パン生地配合（小麦粉 240g、スクロース 20g、食塩 4g、スキムミルク 12g、無塩マーガリン 20g、乾燥酵母 3g、水 170g）に従い、市販強力小麦粉を用いた製パン試験を行った。冷凍保存酵母の場合は 13g 添加した。自動ホームベーカリーのメニュー「天然酵母パン生地」に設定し、生地を調製した。次に、ウォーターオープン（SHARP 製、HEALS10 AX-GX2 型）のメニュー「発酵」にて 35℃-60分間二次発酵後、同オープンのメニュー「オープン（予熱有り）」で 180℃-30分間焼成した。また、米粉を用いた場合のパン生地配合は、（米粉 240g、スクロース 13g、食塩 4g、無塩マーガリン 8g、冷凍酵母 13g、水 240g）または（米粉 240g、グルテン粉末 48g、スクロース 13g、食塩 4g、無塩マーガリン 8g、冷凍酵母 13g、水 215g）を基本として製パンした。なお、米粉は、主要 5 品種（コシヒカリ、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまち、はえぬき）とした。

水分含量の測定

赤外線水分計〔（株）ケツト科学研究所製、FD-600 型〕を用いて、140℃-15分間測定した。

膨化率の測定

焼成後室温で 1 時間放冷したパンの体積は、菜種置換法⁵⁾を用いて測定した。膨化率は、焼成後のパンの体積（ cm^3 ）/焼成前の生地重量（g） $\times 100$ で算出した。また、比容積は、焼成後のパンの体積（ cm^3 ）/焼成後のパンの重量（g）で求めた。

焼減率の測定

焼減率は、パンに含有する水分が焼成中に蒸発する割合を示す。（焼成前の生地の重量-

焼成後のパンの重量）/焼成前の生地重量 $\times 100$ で算出した。なお、焼成後のパンの重量は、室温で 1 時間放冷後のものとした。

色彩測定

焼成後室温で 1 時間放冷したパンの明度および色度は、色彩色差計〔（株）日本電色工業製、NR-11A 型〕を用いて測定し、CIE $L^*a^*b^*$ 表色系で表した。測定項目は、パンの皮（クラスト）の頂点部および側面、パンの内面（クラム）の 3 カ所とし、それぞれ 5 回測定し、その平均値を測定値とした。また、ドライイーストを用いて調製したパンの色彩を基準として E 判定すると同時に、NBS 単位（米国標準局）により、感覚的な差の判定も行った。⁶⁾

破断強度の測定

焼成後室温で 1 時間放冷したパン内相部（クラム部分）を、縦 4cm \times 横 4cm \times 高さ 2cm にスライスした断片試料として、卓上型物性測定器〔（株）山電製、TPU-2 型〕で破断強度を測定した。プランジャーはくさび型 No. 49 を使用し、10mm/sec の圧縮速度、試料の厚さに対して 75% の圧縮を行った。測定は 6 回行い、その平均値を測定値とした。

アミロース含量の測定

米粉のアミロース含量は、比色法により測定した。⁷⁾アミロースとアミロペクチンを所定割合で混合した溶液を用いて測定した検量線から、アミロース含量を算出した。

官能評価試験

焼成後室温で 1 時間放冷したパンを、フードスライサー〔レコмам（株）製、RLS-S19 型〕を用いて、幅 1.5cm に切り出し、研究室員（男性 3 名、女性 1 名）のパネルによる官能評価試験を実施した。評価項目は、日本イースト工業会「パン用酵母試験法」に従い、外観（比容積、焼き色、形均整、皮質）と内相（すだち、色相、触感、香り、味）とし、a-e の 5 段階評価を行い、同試験法の採点基準に準じて評価した。⁴⁾

4. 研究成果

（1）本学園場で栽培・採取した果樹果実 5 種「オウトウ、セイヨウナシ、カキ、ブドウ、リンゴ」21 品種より 200 株の野生酵母を純粋単離した。次に、発酵力の強い株の取得を目指し、2-DG 耐性株の獲得および 1 次スクリーニング（二酸化炭素発生力試験）により 55 株を得た。2 次スクリーニング（エタノール生成力試験および市販小麦粉を用いた生地膨張力試験）により、セイヨウナシ（ラ・フランス、レッドバートレット）由来の酵母を選抜した。さらに詳細に検討した結果、レッドバートレット由来酵母を最終選抜酵母とした。本酵母の 28S rDNA 部分塩基配列を検討した結果、*Saccharomyces cerevisiae* と

99%以上の高い相同性を示したことから、本酵母は *S. cerevisiae* と同定した。

(2) 生育適温試験や生地膨張力試験の結果、生育適温は 30 であり、糖添加条件として低糖での活用の可能性を得た。野生酵母は、冷凍・乾燥耐性に劣るものが多く、長期保存が難しい。YPD 液体培地で振盪培養後、遠心分離で得た酵母(水分含量約 80%)は -28 で 30 日間冷凍保存し、冷凍耐性試験を行った。一方、同様にして得た酵母は凍結乾燥後真空包装し、-20、4、15、30 で 30 日間保存し、乾燥耐性試験に供した。その結果、-28 で冷凍保存した場合、培養初期発酵力(二酸化炭素発生力およびエタノール生成力)は緩やかであるが、24 時間後では、比較として用いた市販ドライイーストと同様の発酵力を示した。一方、凍結乾燥酵母では、いずれの温度帯でも発酵力の低下が顕著であり、その維持や改善が求められた。酵母のストレス耐性には細胞中のトレハロース含量が影響し、その含量が高いほど耐性が強い。培養液へのトレハロース添加により、細胞内にトレハロースの取込みを促し、冷凍耐性を改善できる。グリセロールは食品添加物として甘味料や増粘安定剤などの他、保湿剤や潤滑剤として、医薬品や化粧品に使用される。酵母の急速凍結における低糖度グリセロールは凍結増感剤として作用するが、緩慢凍結の場合凍結保護剤としての役割を果たす。1-6%トレハロースおよび 0.1-2.0%グリセロールを酵母培養前培地添加と培養後培地添加した場合の、発酵力試験を行った。その結果、トレハロースを培地添加し培養後凍結乾燥した酵母では、-28 冷凍保存酵母と比較して、二酸化炭素発生力ならびにエタノール生成力は低かった。1-2%グリセロール添加した場合、-28 冷凍保存酵母と比較して同等の発酵力を呈した。一方、これら試薬を培養後培地添加した場合、グリセロール添加では、培養初期における発酵力は若干劣るものの、単離酵母の冷凍・乾燥耐性向上に寄与した。

(3) 小麦粉を用いたパン生地配合を基に製パン試験を行ない、ドライイーストで製造したパンの特性と比較検討した。その結果、-28 冷凍保存酵母を使用すれば、ドライイーストパン同様に膨化することが分かった。そこで、米粉(コシヒカリ)を用いて製パンした結果、ほとんど膨化しないか、ケーピング(腰折れ)した。そこで、スキムミルク無添加およびマーガリン添加量を減少し、グルテン粉末を米粉重量に対して 20%添加して同様に製パンしたところ、ドライイーストパン同程度に膨化しないものの、どの米粉を用いても膨化した。ヒノヒカリやはえぬきでは均一な形であったが、その他の品種では不均一または膨化不足となった。また、いずれも焼成中にパンが縮む「かま落ち」が発生したが、「こね」や「発酵」などの時間を調整す

ることで改善できると示唆した。水の添加量はパンの膨化に大きく影響するため、加水量を調整し、最適加水量を決定した。原料米粉中の水分含量と加水量には負の相関がみられた。パンの高さは、はえぬき > コシヒカリ、ヒノヒカリ > ひとめぼれ > あきたこまちの順であった。クラストは、コシヒカリとあきたこまちが少し厚く、その他は薄かった。クラムは、ひとめぼれとヒノヒカリでは全体に均一な広がり、コシヒカリとあきたこまちは全体に広がり、はえぬきでは、全体に広がっているものの、不均一であった。膨化率および比容積は、コシヒカリ(227.2%、2.48cm³)、ひとめぼれ(198.6%、2.19cm³)、ヒノヒカリ(266.5%、2.93cm³)、あきたこまち(207.2%、1.97cm³)、はえぬき(243.3%、2.67cm³)であった。焼減率は、ヒノヒカリ(10.6%) > はえぬき(10.1%) > ひとめぼれ(8.7%) > コシヒカリ(8.3%) > あきたこまち(7.2%)の順であり、市販食パン(10-12%)より低く重い食感のパンであった。破断強度は、ひとめぼれ(2.43N) > コシヒカリ(1.90N) > ヒノヒカリ(1.84N) > はえぬき(1.76N) > あきたこまち(1.64N)であり、ドライイースト(1.52N)のそれより高く、硬い食感、すなわち米粉パンのモチモチ食感に寄与した。色彩測定の結果、あきたこまちを除く他品種では、側面より頂点の明るみや赤みが強かった。NBT 単位による判定を行ったところ、頂点ではコシヒカリとはえぬきは「非常に大きく」、ひとめぼれ「かなり」、ヒノヒカリ「大きく」、あきたこまち「わずかに」であった。側面は、ひとめぼれは「大きく」であり、その他は「目立って」であった。一方、内相(クラム)は、コシヒカリ、ヒノヒカリ、はえぬきが「大きく」であり、ひとめぼれとあきたこまちは「非常に大きく」であった。官能試験の結果、皮質はひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまちで、すだちはあきたこまちを除くすべての品種で、色相は品種間で差はあるが、あきたこまちで、触感はコシヒカリを除くすべての品種で、香りはヒノヒカリで、味はコシヒカリ、ヒノヒカリ、はえぬきで対象パン(ドライイーストパン)より高かった。香りでは、単離酵母特有の風味を強調したパンとなった。

米粉を用いたパンは、小麦粉パンの小麦の一部を米粉に置換した部分置換パン、米粉にグルテンを添加したグルテン添加パン、グルテンを使用しないグルテンフリーパンに大別される。部分置換パンは、コンポジットブレッドの一種であり、2 割程度までの米粉または炊飯米の添加により、従来の技術で比較的容易に製パン可能となるが、⁸⁾ 米粉の配合割合の増加に伴い製パン性が低下する。⁹⁾ グルテン添加パン製造におけるグルテン配合割合は、米粉に対して 20%程度が最適とされている。一方、グルテンフリーパンは、発酵過程で発生するガス保持の役割をもつ粘質物質を、グルテン以外に求めたものである。

増粘多糖類を米粉に対して 2%程度添加することにより、米粉パン生地の発酵中または焼成中のスポンジ状組織形成や維持を可能とすること、¹⁰⁾ 米を 化させることで粘性を付与すること、¹¹⁾ 米粉製粉時に 化米を用いること、¹²⁾ 樹脂発砲技術を応用した製パン法、¹³⁾ 糊化した膨化米を米粉と混合する方法、¹⁴⁾ 化米と増粘多糖類を混和する方法¹⁵⁾などが検討されているが、高品質な小麦粉パンと比較し、未だ十分な技術開発とは言い難い。

以上本研究は、山形県産セイヨウナシ(レッドバートレット)果実より単離した野生酵母を使用した場合、形均整や比容積は小麦粉パンに比べて若干劣るものの、米粉パン特有のパリッとしたクラストとモチモチしたクラムの触感、ならびに野生酵母特有の風味を兼ね備えた高品質な製パンを可能とした。

<引用文献>

1. http://www.eiken.pref.kanagawa.jp/002_kensa/02_microbe/detailed/files/09_sensyoku.pdf
2. 関口昭博. 製パン用酵母「美の和酵母」の改良研究. 群馬県立群馬産業技術センター研究報告, 2008, 9-12.
3. 木下富雄, 田中麻友. パン用野生酵母の花・果実からの分離. 兵庫大学論集, 12, 2007, 71-82.
4. パン用酵母試験法(日本イースト工業会編, 1996, 3-4).
5. 川端晶子. フローチャートによる調理科学実験. 地人書館, 1992.
6. 人見哲子, 漆原真弓. 玄米粉(COCORO)と小麦粉の割合がパンへ及ぼす影響. 美作大学・美作大学短期大学部紀要, 56, 2011, 15-21.
7. 高野克己, 渡部俊弘. 食品理科学実験書. 三共出版, 2000.
8. 奥西智哉. 炊飯米を生地に添加したパンの官能評価. 日本食品科学工学会誌, 56, 2009, 424-428.
9. 田中康夫, 松本博光編. 製パンの科学(II)光琳, 2008.
10. 中村幸一, 諸橋敬子. パン製造用の米粉及び米粉を用いたパンの製造方法. 特許公開 2005-245409 号(2005).
11. <http://nishioka-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/research/komepan.html>
12. 西岡昭博, 香田智則, 池田進, 小山清人, 東野真由美. 化穀粉の製造方法及び製造装置. 特許公開 2007-75104(2007).
13. 藤井恵子, 東野真由美, 高橋辰弘, 小山清人. 米粉を主原料として架橋ネットワーク構造体を形成する方法と、米粉を主原料とする含泡食品用生地と含泡食品とパンとその製造方法. 特許公開 2003-189786(2003).
14. 大塚節子. 小麦蛋白質を含まない生地焼成食品及びその製造方法並びに酵母生

地用プレミックス. 特許公開 2006-174822(2006).

15. 加藤進. うるち米を主原料とする加工食品を製造するためのプレミックス粉. 特許公開 2007-215401(2007).

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

永井 毅・中川智行. 山形県産セイヨウナシ(*Pyrus communis* L. var. *sativa* DC.) から単離した野生酵母の製パンへの応用. 日本食品化学学会第 22 回総会・学術大会(高知市文化プラザかるポート)(平成 28 年 6 月 2,3 日).

[その他]

ホームページ等

<http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~tnagai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 毅(NAGAI, Takeshi)

山形大学・農学部・教授

研究者番号: 1 0 3 8 5 5 0 2