

原 著

レーズンより単離した酵母の同定および製パン特性

河野 篤子* 甲斐 達男** 竜口 和惠***

〈要 旨〉

レーズン培養液より単離した酵母を用いて菌の同定をおこない、その製パン特性を検討し、以下の結果を得た。

1. レーズン培養液より単離した酵母は、電子顕微鏡による観察、炭素化合物の同化性、糖類の発酵性、硝酸塩の同化性および核型分析結果より *Saccharomyces cerevisiae* と同定した。
2. レーズンより抽出した酵母を用いて焼成したパンと、標準として市販の圧搾酵母を用いたパンの品質を評価すると、生地発酵力、焼成後の外観および内相の状態は標準に比較すると劣るが、食味は良好であった。

キーワード：レーズン、酵母、製パン特性

緒 言

製パンの歴史は、紀元前4000年頃から薄い煎餅状の無発酵のパンが作られるようになり、約6000年前に古代エジプトで現在のような発酵パンが、作られるようになったといわれている¹⁾。当時のパンは平焼きの生地が放置され、細菌と野生酵母の繁殖により発酵したもので、乳酸菌、酢酸菌などの産出した乳酸や酢酸によるかなりすっぱいものであったと考えられている。聖書中の「LEAVEN」(パン種)は生地中の酵母、乳酸菌を表わすと思われ、パン種を作るという伝統的な手法は、パネトーネ、サンフランシスコサワーブレッドなどの製パンの手法に残されている¹⁾。

一方、中世以来ビールやワインなどの醸造による副生酵母がパンに利用されてきた。しかし、発酵力、保存性などが不安定で、人為的な管理によるイースト製造が18世紀末よりおこなわれるようになって初めて発酵の安定性が確保された。わが国においても国産イーストの製造、販売が1931年より開始された²⁾。現在、食生活が豊かになり、おいしいパンが求められるだけでなく、健康志向も強くなってきている^{3, 4)}。おいしいパンの条件はパン焼成時の特有の芳香と内相の食感にあるといわれている。サワー種、ホップス種、果実種、酒種、パネトーネ種といった伝統的な発酵種^{1, 5)}による製パンは欧米だけでなく、酒種を使用したあんパンなど日本でもおこなわれてきた。伝統的な発酵種

を用いたパンは、それぞれのパン種に特有の芳香を持ち⁵⁾、身近な天然素材が原料であることなどから見直されている。そのなかで、比較的容易に酵母を培養できるレーズンを用いた方法⁶⁾で、酵母を単離し、その同定および製パン特性を検討した。その結果、特有の芳香をもつパンを焼成することができたので報告する。

実験方法

1. 試料の調製

自然食品センター社のノンオイルコーティングのアメリカ産レーズン(94年度産)を用い、100gずつ測定して、脱気密封後冷凍保存した。解凍は室温でおこなった。滅菌した密封容器に試料100gと蒸留水300mlを加え、25℃に保温して放置後1日目から10日目にレーズン培養液を採取し、YM寒天培地(0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ペプトン、1.0%グルコース、1.0%寒天、pH5.4)上で25℃、3日間培養した後、酵母の集落数の計測および形態の観察をおこなった。実験に用いたレーズン培養液は10日目にレーズンをろ過して分離し、その上澄み液を用いて形態別に単離した後、YM液体培地(0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ペプトン、1.0%グルコース、pH5.4)に5白金耳を移植し、25℃、2日間振とう培養し、3000rpmで10分間遠沈後、沈殿物に生食水を加えて洗浄し、再び遠沈し

* 京都女子大学家政学部食物栄養学科

** Corresponding Author, 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科

*** (元)西南女学院大学保健福祉学部栄養学科

た。この操作を2回繰り返し、以下の実験の試料とした。また、培養後の生育を570nmで測定し、使用時にはほぼ同一の濃度になるよう調製した。

2. 酵母の同定

1) 走査型電子顕微鏡による形態の観察

形態の観察試料は、YM寒天培地上のそれぞれの集落を単離後、YM液体培地で一晚培養した液に、直接10%グルタルアルデヒド (GA) を2%になるように加えて一晚おいて固定し、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.2) で5回洗浄してGAを完全に除去した後、1%オスミウム酸溶液 (0.05Mリン酸緩衝液、pH7.2) で1時間の後固定を行なった。その後、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.2) で2回、蒸留水で1回洗浄し、30、50、70%のエタノール系列で脱水し、さらにtert-ブタノールで3回脱水した後、凍結乾燥した。この試料についてRMC-Eiko Curp蒸着装置で金蒸着を行なって、走査型電子顕微鏡 (日本電子JEOL-JSM-5200型) により加速電圧20kvで観察した。

2) 炭素化合物の同化性試験

Difco社製のBact-Yeast Nitrogen Base (炭素化合物同化試験用) を用いて液体培養試験法⁷⁾ によりおこなった。炭素源はグルコース、ガラクトース、ショ糖、麦芽糖、ラクトース、メリビオース、ラフィノース、イノシトールを用いた。比較のため、*Saccharomyces cerevisiae*のタイプカルチャー (IFO1027)、市販のドライイースト (S.I.Lesaffre社) についても同様の観察をおこなった。真の吸光度 = (1週間後の各炭素源添加培地のOD₅₇₀ - 実験開始時の各炭素源添加培地のOD₅₇₀) - (1週間後の炭素源無添加培地のOD₅₇₀ - 実験開始時の炭素源無添加培地のOD₅₇₀) によって求めた。

3) 糖の発酵試験

調製した試料を200mlの生食水に懸濁した後、20mlをアインホルン管に分注し、グルコース、ガラクトース、ショ糖、麦芽糖はそれぞれ5%濃度になるように、ラフィノースは10%濃度になるように添加し、30℃に保温し炭酸ガス発生の有無を観察した。比較のためドライイーストについても同様の観察をおこなった。

4) 硝酸塩の同化性試験

調製した試料を培地 (グルコース、20gリン酸水素カリウム1g、硫酸マグネシウム0.5g、寒天20g) に

加えて固化させ、オキザノクラフ法により25℃で2日間培養した⁷⁾。

5) 胞子形成能

調製した試料をKleyn培地 (ペプトン2.5g、グルコース0.62g、塩化ナトリウム0.62g、酢酸ナトリウム5g、寒天20g、pH6.9~7.1) に接種し、25℃で1週間培養しZiehlの石灰酸フクシン液を用いた胞子染色をおこない顕微鏡で観察した⁷⁾。

6) 核型分析による酵母の同定

パルスフィールド電気泳動法により核型分析をおこなった。試料は、調製した試料をYPG培地 (10%酵母エキス、2%ペプトン、2%ブドウ糖、pH5.6) で培養し、常法⁸⁾ を一部修正して作成してCHEF-DR IIシステムでおこなった。1%のアガロースを含有する0.5×TBE (1mM EDTAを含む45mMトリス-ホウ酸緩衝液pH8.0) を用いて、0.5×TBE緩衝液を14℃に保温し循環させて泳動をおこなった。泳動条件は60秒パルスタイム12時間、170Vで泳動した後、さらに90秒パルスタイム8時間、170Vでおこなった。染色はエチジウムプロマイド0.5μg/ml (0.5×TBE) 溶液に2時間浸して染色した後、0.5×TBE緩衝液中で1晩脱色を行なった。*Saccharomyces cerevisiae*属の各種酵母と泳動パターンを比較するため、*Saccharomyces cerevisiae*のタイプカルチャー (IFO10217)、市販のビール酵母 (Lallemand社製)、市販のワイン酵母 (Lallemand社製)、ドライイーストおよび市販のパン用圧搾酵母 (鐘淵化学工業製以下圧搾酵母) の核型分析もおこなった。

7) 製パン試験および生地発酵力試験

製パン試験は日本イースト工業会の方法⁹⁾ を一部修正した2時間ストレート法によりおこなった。生地の配合および製パン条件は図1、表1に示す。ミキシングは製パン用ミキサーを使用し、低速 (L) 3分、中速 (M) 2分行い、ショートニングを加えた後、さらに中速3分、高速 (H) 2分行った。市販圧搾酵母 (鐘ヶ淵科学工業製) をコントロールとした。

品質評価は鳥越製粉研究部に依頼し、日本イースト工業界の方法⁹⁾ に従って実施された。生地発酵力試験に用いる試料は、レーズン培養液より単離した酵母をYPD培地で30℃2日間振とう培養し、田中らの方法⁹⁾ に従って糖蜜培地で培養したものを8000rpm、20分間遠心分離し、水で1回洗浄して作成した。使用量は1000gに対して、菌体重量の水分含量が63.5%にな

るようにし、酵母重量は30gと統一した。比較のため、圧搾酵母、圧搾酵母の培養菌体、天然酵母培養菌体（ホシノ天然酵母パン種製以下天然酵母培養菌体）を用いて同様の試験をおこなった。

ミキシング	L3M2 ↓ M3H2
↓	
こね上がり生地温度	27℃
↓	
フロアタイム(一次発酵)	2時間 (27℃、湿度75%)
↓	
パンチ	90分 (27℃)
↓	
分割	460 g
↓	
ベンチタイム	20分 (27℃)
↓	
ホイロ (二次発酵)	生地頂点が焼型上 1 cm
↓	
焼成	210℃、24分

図1 製パン条件

表1 生地の配合

材料	重量 (g)
パン用小麦粉 ¹⁾ (1等粉)	1,000
砂糖	50
塩	18
脱脂粉乳	20
イーストフード ²⁾	7
イースト ³⁾ (63.5%水分ベース)	30
ショートニング	50
水	670

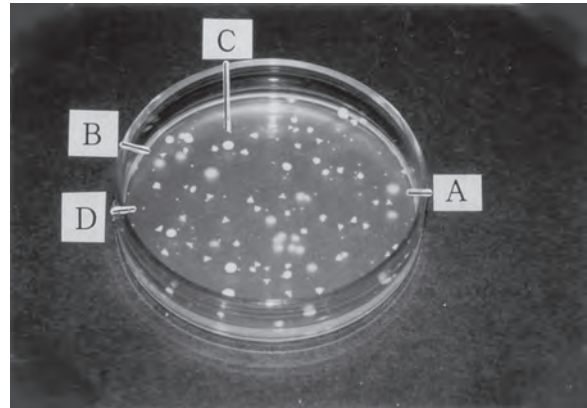
- 1) うたまろ (鳥越製粉会社製)
- 2) VX-2 (鳥越製粉会社製)
- 3) 形状Aのレーズン単離酵母

実験結果

1. 酵母の単離および同定

レーズンは培養3日目より発酵が始まり、1週間後には水面に浮上した。培養液をYM寒天培地で培養した結果、培養1日目で5種の形状の異なる集落が認められた。A-周囲の不明瞭な円形集落、B-星形集落、C-表面の盛り上がった円形集落、D-小さい点状集落、E-盛り上がった赤色円形集落とした。Eは培養2日目以後観察されなかった(図2)。各酵母の集落数の経時的変化をみると、各酵母の集落数は培養3日目まで急激に増加し、ガスの発生が最も盛んになり、培養4日目で最大値を示したがその後やや減少して5

日以後ほぼ一定となった。培養2日目以後におけるDの集落数の増加は他の酵母に比較すると低かった(図3)。Dについて単離したが、細菌培養液のような特異な臭いがあり、酵母の増加にどのような影響をおよぼすかは不明である。



A: 周囲の不明瞭な円形、B: 星型、C: 表面の盛り上がった円形、D: 点状

図2 集落の形態

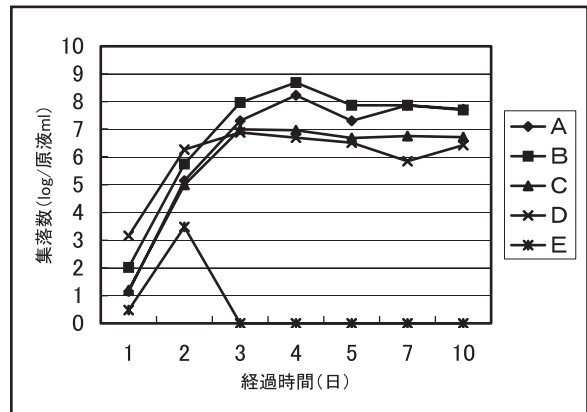


図3 レーズン単離酵母集落の経時的変化

レーズン培養液中の酵母は4種の異なる形状の集落を示したため、各酵母の単離を行った。A~Cの酵母について各々単離操作を繰り返したが、どの酵母についても培地上の位置によって上述の3種類の形状が認められた。そこで、市販のドライイースト(S.I.Lesaffre社)を培養して集落の形状を観察したがレーズン抽出液に見られるのと同様に3種類の形状を示したことから培地の位置によって形状は異なるが、A~Cは同一の酵母であると推定した。また、Dはドライイーストでは見られなかったことから酵母ではない可能性が考えられた。

そこで、形状Aのレーズン単離酵母、および形状Dの菌について電子顕微鏡による形態観察を行った結

果、図4に示すように形状Aのレーズン単離酵母における細胞の形態はレモン型であり、多極出芽を示した。Dについて同様の観察を行ったが、酵母ではなく桿菌であることが認められた(図5)。

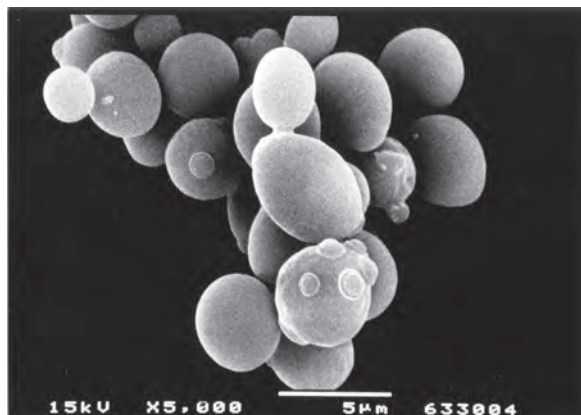


図4 形状Aのレーズン単離酵母の走査電子顕微鏡写真



図5 形状Dの走査顕微鏡写真

形状Aのレーズン単離酵母および比較のための *Saccharomyces cerevisiae* のタイプカルチャー (IFO10217) および市販ドライイースト (S.I.Lesaffre社) を比較とした場合の炭素化合物の同化性に関する検討結果を表2に示した。形状Aのレーズン単離酵母は、ブドウ糖、ガラクトース、ショ糖、麦芽糖、ラフィノースは同化性を示し、比較の2種類の酵母と同様の結果であった。乳糖、イノシトールにはいずれの酵母も同化性を示さなかった。これに対して、形状Aのレーズン単離酵母の発酵性は、ブドウ糖、ショ糖、麦芽糖、ラフィノースでは1時間以内に炭酸ガスの発生がみられたが、ガラクトースでは6時間後にみられた。また、ラクトースでは炭酸ガスの発生はみられなかった。ドライイースト (S.I.Lesaffre社) でもブドウ糖、ショ糖、麦芽糖、

ラフィノースで同様の結果がみられた。

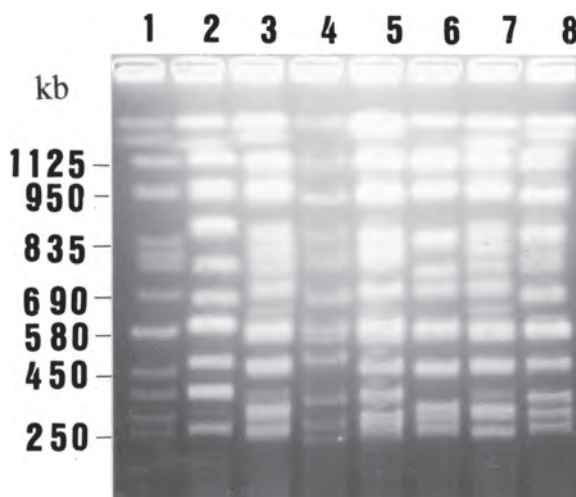
形状Aのレーズン単離酵母の硝酸塩の同化はみられず、球形の子のう胞子形成が観察された。

核型分析の結果を図6に示した。*Saccharomyces cerevisiae* のタイプカルチャー (IFO10217)、市販のパン用酵母、ワイン酵母およびビール酵母といった様々な *Saccharomyces cerevisiae* 属の泳動パターンとレーズン単離酵母の泳動パターンを比較すると、類似のパターンがみられ、*Saccharomyces cerevisiae* 属の範疇にはいることがわかった。以上の結果より形状Aのレーズン単離酵母が、渡邊らの報告¹⁰⁾と同様に *Saccharomyces cerevisiae* であると同定した。

表2 炭素化合物の同化性

炭素化合物	酵母	レーズン単離酵母	比較1 ¹⁾	比較2 ²⁾
Glucose		+++	++	+++
Galactose		++++	++	+++
Sucrose		+++	++	+++
Maltose		+++	++	++
Lactose		-	-	-
Melibiose		±	±	-
Raffinose		++	+	+
Inositol		-	±	-

- 1) *Saccharomyces cerevisiae* のタイプカルチャー (IFO10217)
 2) 市販のドライイースト
 3) 0.05>±、~0.10>+、~0.20>++、~0.25>+++、~0.26<++++



- 1: マーカー1 (AB1380)、2: マーカー2 (S288C)、3: 形状Aのレーズン単離酵母、4: *Saccharomyces cerevisiae* のタイプカルチャー (IFO10217)、5: 市販ワイン酵母 (Lallemand社製)、6: 市販搾酵母 (鐘淵化学工業製)、7: 市販ドライイースト (S.I.Lesaffre社製)、8: 市販ビール酵母 (Lallemand社製)

図6 各種酵母の核型分析結果

2. 生地発酵試験および製パン試験

図7に示すように生地の発酵力は圧搾酵母が最も強く、約1時間で最大値を示した。その後一時低下したが、約3時間一定の状態を保ち、その後低下した。圧搾酵母培養菌体、天然酵母培養菌体は同様の傾向を示し、3時間半で最大値に達した。その後2時間一定の状態を保ち低下した。形状Aのレーズン単離酵母は最初の5時間はほとんど発酵力に変化がみられず、5時間から20時間にかけて緩やかに上昇し20時間で最大値に達した。製パン試験による品質評価では圧搾酵母、酵母培養菌体、天然酵母培養菌体に比較すると形状Aのレーズン単離酵母は、外観、内相ともに最も低い値であり、比容積も2.80と他の酵母の約60%と低い値であった。しかし風味のうち、食感は劣るが、焼成後レーズン単離酵母の発生する特有の芳香があり、食味は市販の酵母より高い評価を得た(表3)。

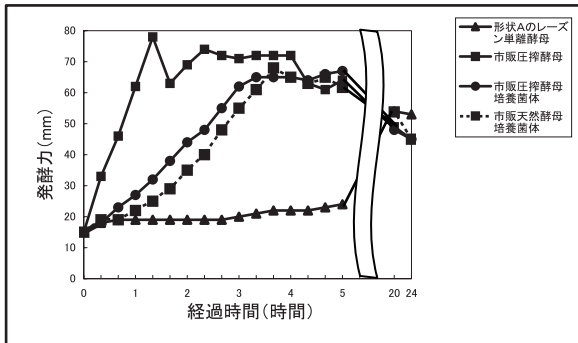


図7 生地膨張力テスト

表3 製パンの品質評価

		形状Aのレーズン単離酵母	市販圧搾酵母	市販培養酵母培養菌体	市販天然酵母培養菌体
外観	ボリューム(10)	2	8	6	8
	表皮の色(8)	5	6	4	6
	焼上均整(3)	3	3	3	3
	形均整(5)	4	4	4	4
	表皮の質(4)	1	4	4	4
内相	すだち気泡(7)	1	5	4	3
	膜厚(8)	1	6	5	4
	色相(10)	2	8	5	7
	触感(15)	2	12	13	12
風味	香り(10)	8	8	8	7
	味(10)	10	8	8	8
	食感(10)	2	8	8	8
合計(100)	41	80	72	74	
重量(g)		391.5	388.5	402.6	397.8
		395.4	393.1	399.6	396.6
容積(ml)		1100	2024	1988	1925
		1100	2020	1938	1972
比容積(ml/g)		2.81	5.21	4.94	4.84
		2.78	5.14	4.85	4.97
平均		2.80	5.18	4.90	4.91

() 内の数値は満点時の評価

考 察

現在、健康的でおいしいパンが求められていることから、身近な天然素材であるレーズンから酵母の単離を試みた。レーズンに水を加えて10日間放置して得た培養液より単離し、3種類の集落を得た。それぞれの集落について単離操作を繰り返したが、単一の集落が得られなかった。そこで、市販のドライイーストの培養による集落比較した結果、ドライイーストでも同様の3種類の集落がみられたことから、レーズンの抽出液中に見られる3つの形態の異なる集落は同一の酵母であると推定し、そのうち形状Aのレーズン単離酵母について同定および製パン特性を検討した。同定の結果、*Saccharomyces cerevisiae*であることがわかった。

また、製パン特性を検討するため、日本イースト工業会の方法⁹⁾による生地発酵力試験、製パン試験をおこない、形状Aのレーズン単離酵母と市販の圧搾酵母、酵母培養菌体、天然酵母培養菌体を比較した。形状Aのレーズン単離酵母は、生地発酵力および製パン試験による品質評価のうち外観、内相の評価は市販の酵母および培養菌体に比較すると劣っていたが、特有の芳香をもち、味は最もよい評価を得た。市販の酵母は、工業的に純粋培養、凝縮されたもので、効率よく培養されるため、発酵力が強くポリウムのあるパンを作成することができる。しかし、天然素材からおこした発酵種では、菌数の増殖は市販の酵母と比較すると劣るため^{11), 12)} 生地発酵力、膨張力は低い。パンには最低限のポリウムは必要であるが、天然素材から種をおこしてパンを作成する場合、発酵に時間はかかるが、焼成時に生じるそれぞれのパン種のもつ独特の風味や味を楽しむことが目的である¹²⁾。

形状Aのレーズン単離酵母を用いたパンは市販酵母を用いたパンに比較すると、焼成後に生じる特有の芳香があり、味がよいという結果を得た。パンの香りは発酵、焼成が重要で、発酵中に生成されるアルコール、有機酸、アルデヒドなどが影響を与える⁵⁾。市販のパン用酵母とリングおよびレーズン種を用いたパンのグラム部分の香味成分を、パン焼成後に比較分析した結果によると、市販のパン用酵母を用いたパンの香味成分の大部分は芳香性アルコールであるが、他の2種のパンではわずかに低く、この差に寄与している物質は、リングおよびレーズン種の酵母が生成するアルデヒド類、3ヒドロキシ2ブタノンなどであり、市販のパン用酵母のような高エタノール生成菌とは違った香気を付与しているとある¹³⁾。今回の結果において、レーズ

ン単離酵母で風味の評価が高かったことと関連していると考えられる。しかし、レーズン単離酵母は市販酵母と比較すると発酵にかなりの時間を要し、焼成後の品質評価も低い結果となった。今後この酵母の特性を生かしたパンを作成するため、小麦粉の選択、混ねつ条件、発酵時間、焼成温度および焼成時間など検討を加えていきたい。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、電子顕微鏡観察のご指導をいただいた九州大学農学部河口豊教授、また製パン試験等に多大なご協力をいただいた鳥越製粉株式会社研究開発部門の関係者の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 越後和義 (1976), パンの歴史, 「パンの研究—文化史から製法まで—」, 阿久津正蔵監修, 柴田書店, 東京. pp.11-24
- 2) 越後明 (1992), イースト, 「製パンの科学 (II) 製パン材料の科学」田中康夫, 松本博編, 光琳, 東京, pp.57-90
- 3) 安達巖 (1983), 日本のパンの歴史と展望, 食の科学72, 11-15
- 4) 折井英雅 (1983), パンの需給動向と嗜好の移り変わり, 食の科学72, 26-22
- 5) 田中康夫 (1987), 醗酵・熟成がつくるパンの味と香り, 食品と開発22, 44-49
- 6) 農文協 (1986), 「おいしくて安全国産小麦でパンを焼く」, 農文協, 東京. pp.120-124
- 7) 長谷川武治編著, (1984), 酵母の分類と同定試験法, 「微生物の分類と同定 (上)」, 学会出版センター, 東京, 153-182
- 8) Carle, G. F., Frank, M. and Olson, M.V. (1987), Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field, *Science* 232, 65-68
- 9) 日本イースト工業会 (1991), V製パン試験法, 「パン用酵母試験法」, 日本イースト工業会編, 東京, 8-16
- 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) 吉野精一 (1993), 古くて新しい発酵種の利用法①, B&C9-10, 38-41
- 12) 吉野精一 (1993), 古くて新しい発酵種の利用法②, B&C11-12, 45-47
- 13) 吉野精一 (1994), 古くて新しい発酵種の利用法③, B&C1-2, 36-40

Identification of Yeast Isolated from Raisins and its Bread Making Properties

Atsuko Kohno*, Tatsuo Kai**, Kazue Tatsuguchi***

<Abstract>

A strain of yeast isolated from raisin culture fluid was identified microbiologically and was examined for its bread making properties, resulting as follows. 1. The yeast strain isolated from the raisin culture fluid was identified as *Saccharomyces cerevisiae*, according to the results from observation by electron microscope, the assimilability of the carbon compound, the fermentability of the saccharide, assimilability of the nitric, and the karyotype analysis. 2. The baking quality of the isolated yeast was inferior to a commercial pressed yeast in several points, such as gassing power on dough fermentation, loaf appearance, and crumb structure, but was superior on the point of taste and flavor.

Key words: raisin, yeast, bread making properties

* Department of Food and Nutrition, Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University

** Corresponding Author, Department of Nutritional Sciences, Faculty of Health and Welfare, Seinan Jo Gakuin University

*** Department of Nutritional Sciences, Faculty of Health and Welfare, Seinan Jo Gakuin University (Formerly)