

酵母の利用に関する研究 (その1)

—ブドウ酒から分離された天然酵母を用いるパンの加工—

三 好 康 之

The Utilization of Yeast (1)

— On Bread baked after Fermentation
using Yeasts Isolated from Wine —

Yasutaka Miyoshi

要約 市販ブドウ果皮から野生酵母を分離し、その分離された酵母を使用して天然酵母パンを焼くことを目的に、この実験を行った。焼きあげたパンの味や香りのバラエティを求め、市販ブドウ果実の種類や産地を変え、それらを皮ごと個別にそれぞれ発酵させてブドウ酒を造り、その果皮に付着している野生酵母を増殖させてから分離する方法を試みた。しかし、カビの大量発生のために、目的とする野生パン酵母は分離できなかった。次に天日乾燥した外国産干しブドウを発酵させ、野生酵母を分離する方法を試みた。この場合もカビの発生が最大の難点で、それを抑制するために、密封瓶内に適量のエチルアルコール添加を試みた。その結果カビの発生が抑制され、容易に野生酵母を分離することができ、目的とする香の良い天然酵母パンを焼くことができた。

はじめに

現在の日本の食生活は、献立の洋風化と多様化に伴って、ゆっくりとはあるが主食は伝統食である米食から、パン食に変わってしまったような錯覚を覚える。それは、デパートやスーパーの食品売り場や街角の、手作り・焼きたてパンを主力商品としているパン屋の店頭では、焼き上がり時間に合わせて焼きたてロールパンやアンパンを買おうとする人々の長い列ができ、まさに「焼きたてパンブーム時代になった」と思わせる風景が見られるからである。こうした現象は、1995年本格化したコンビニエンス・ストアチェーンによる「焼きたてパン」販売が浸透し、焼きたてパンのおいしさを味わった人々の欲求の現れと受け止められる。

小さな面積のパン屋で焼きたてパンの販売が可能になった理由は、バイオ技術によるパン酵母の改良があげられる。こうした焼きたてパンの大部分は冷蔵あるいは冷凍耐性酵母を用い、工場ですでに一次発酵を終え、冷蔵あるいは冷凍されたまま配送されたパン生地なので、それをパン屋が購入し、必要に応じて必要量のみ、解凍・成形・発酵・焙焼して商品化できる。そのため生地を捏ねる場所や機械が不要で、売れ筋商品や販売時間に合わせ、計画的にパンを焼き上げることができる。このことは販売者にも消費者にも利点が多い。このため、焼きたてパンの一大ブームとなり、それが冷凍耐性酵母の需要拡大にも貢献し、今や細胞融合技術等で育種した冷凍耐性酵母の実用化では、日本は世界で最も進んでいる国といわれている。¹⁾

更にこの現象に輪をかけたのが天然酵母パンブームである。これは干しブドウ等を原料にし

て、それに付着している種々の野生酵母を発酵増殖させ、それら野生酵母の混合培養液をろ過し、そのまま天然酵母種として焼いてあるので、複雑な香がすばらしい自然志向パンである。テレビ等でのこれら自然嗜好食品紹介の繁茂な放映、インターネットでの天然酵母パンの焼き方の紹介やそれら製品の通信販売などにより、「天然酵母あるいは野生酵母パン」は健康志向食品として、一大ブームとなっている。²⁾

ところでパンに用いられる酵母はサッカロミセス属で、この属には食品、醸造、発酵工業に最も関係の深い酵母がたくさん含まれている。代表種は *Sacchromyces cerevisiae* でグルコース、サッカロース、マルトース、ガラクトースを発酵し、ラクトースを発酵しない。多くの菌種があり、パン酵母、ビール酵母、アルコール酵母あるいは清酒酵母などがこれに属している。³⁾

今回ブドウ果皮に付着している野生酵母に着目し、ブドウの種類や産地によって分離できる酵母の違い、それらを用いたパンの味に興味を持ち、野生酵母の分離とそれを用いた天然酵母パンの加工・試食を目的に実験を行った。なお標準酵母として、市販乾燥酵母スーパーカメリヤ（日清製粉(株)市販のパン酵母、以下カメリヤと記す）、広大セレビジエ (*Sacchromyces cerevisiae* 7099) を使用し、焼き上がりパンについての比較検討を行った。

実験方法及び結果

ブドウ酒から野生酵母の分離培地

野生酵母をブドウから直接分離することが出来なかったため、まずブドウ果実と果皮をつぶしカビの発生を防ぐため密封瓶中で発酵させた。干しブドウはそのまま瓶に入れて密封し発酵させ、ブドウ酒中から野生酵母を分離することにした。試行錯誤した結果、酵母の分離は分離操作過程で野生酵母の育ちが特に良かった次に示す培地を主に分離培地として用い実験した。

麹エキス寒天培地の組成

塩化カルシウム	0.02 g	硫酸マグネシウム	0.1 g
リン酸一カリウム	0.20 g	硝酸カリウム	0.4 g
マルトエキストラクト	20 g	寒 天	4 g
蒸留水	200 ml	pH 6.0	

ポテトデキストロース寒天培地の組成

ポテト抽出液末	0.4 g	寒天	1.5 g
ブドウ糖	2.0 g	蒸留水	100 ml
pH 6.0			

ブドウ果皮に付着している野生酵母の分離

1. 生ブドウ酒からペトリフィルム⁴⁾を用いての分離

滅菌大型試験管の中に市販ブドウ2種類（ピオーネ、ベリー-A）の皮をおさえつぶした10粒と砂糖2gを入れ、シリコ栓をし、27°Cの孵卵器の中で7日間発酵させる。その試験管から一白金耳10mlの滅菌生理食塩水に移植混合し、普通寒天培地上に画線し、再び27°Cで3日間培養する。生育した菌をYM培地ペトリフィルムに鈎菌移植し、3日間、27°Cで培養する。生育した青緑色の菌をポテトデキストロース培地シャーレに移植し、27°Cで3日間培養後、酵母の観察をした。野生酵母はピオーネのみから4個（ピオーネ1, 2, 4, 7）分離された。

2. 生ブドウ酒から麹エキス培地を用いての分離

滅菌大型試験管の中に皮付きの市販ブドウ4種類(マスカット, 巨峰, ニューピオーネ, デラウェア)の5~6粒を割って入れ, グラニュー糖を1g加え, ガラス棒でつぶしシリコ栓をし, 27°Cの孵卵器で7日間発酵させる。カビの少ない巨峰, ニューピオーネ, デラウェア, マスカットのそれぞれの試験管の中から一白金耳とり, それを50°Cに冷やした麹エキス寒天培地の中に直接混ぜてシャーレに移植する場合, および麹エキス寒天培地を溶かしてシャーレに移し固めた表面にそれぞれの菌を一白金耳とり, 画線培養する。5日後観察した結果, 前者はあまり育っていなかったが後者はよく育っていた。以後後者の方法を採用した。野生酵母は巨峰のみから2個(巨峰4-3-1, 4-3-2)分離された。

3. 生ブドウ酒からポテトデキストロース寒天培地を用いての分離

カビの発生を防ぐため, 滅菌密栓ビンの中に皮付きの市販ブドウ5種類(巨峰・中野, ピオーネ・岡山, ニューベリーA, 広島マスカット)の5~6粒を割り入れ, グラニュー糖を1g加え, ガラス棒でつぶし, 密栓し, 27°Cの孵卵器で7日間発酵させる。発酵密封瓶の中から一白金耳とり, それを50°Cに冷やしたポテトデキストロース寒天培地をシャーレに移し固めた表面にそれぞれ画線培養し, 5日後酵母を分離する。野生酵母はピオーネから2個(ピオーネ10-1, 10-2)分離された。

4. 干しブドウ酒からポテトデキストロース寒天培地, 普通寒天培地を用いての分離

天日乾燥した干しブドウの入手に苦労したが, 幸い生協広島の信頼できる商品が手に入ったので, 従来の方法及びカビを防ぐためエチルアルコール(今回焼酎甲類を薄めて使用)を添加して発酵させることにした。干しブドウ100g, 滅菌水200ml, 砂糖5gを混合して密栓5個(番号1~5), あるいは他の組成は同一に200mlの滅菌水中にそれぞれ12.0, 5.6, 4.0%エチルアルコールを含む密栓瓶各1個(番号6, 7, 8)の計8個を用意した。27°Cの孵卵器で7日間発酵させ, ポテトデキストロース寒天培地, 普通寒天培地を用い, 酵母を分離する。エチルアルコールを含まない瓶には大量のカビが見られたが, エチルアルコール添加の瓶にはカビは見られなかった。無数の野生酵母が分離されたが, 発酵試験等から選択し, 野生酵母を16個(発酵力の強い酵母のみ)分離した。なお, エチルアルコール12%含有瓶(番号6)から酵母は分離できなかった。

分離野生酵母の発酵試験

1. ダーラム管発酵法

逆さに入れたダーラム管付きの試験管に, 酵母発酵試験用培地(酵母エキス4.5g, ペプトン7.5g, ブドウ糖60gを1ℓの水に溶かす)を約20ml入れ, 高圧滅菌する。分離後普通寒天斜面培地で培養しておいた被検酵母を一白金耳摂取し, 27°C, 24時間培養する。ダーラム管中にたまったガスの量で, 発酵力を比較した。

2. アインホルン管による発酵試験

ダーラム管発酵法試験に用いた同じ培地をアインホルン管に注ぎ, 高圧滅菌する。分離酵母を一白金耳摂取し, 27°C, 24時間培養し, アインホルン管中にたまったガスの量の多少で発酵力を比較する。この結果をパンを加工する基礎データとした。1, 2の結果をまとめ表1に示す。

分離野性酵母の大量培養

1. ニュートリエントブロースをを用い前培養した酵母の培養

ニュートリエントブロー 8g, 食塩 5g 及びブドウ糖 60g を蒸留水 1ℓ に溶かし, 10ml ずつ L 型試験管に分注し, 高圧蒸気滅菌し, 斜面培地から分離酵母を移植する。被検酵母と比較するために, カメリヤを同様に操作する。振とう恒温槽で 27°C, 140 rpm, 3 日間振とう培養後, L 型試験管からメスピペットで 1ml ずつ培養液を採り, それぞれ L 型試験管と同じ培地 200 ml をいれ高圧滅菌した坂口フラスコに移植する。それを, 27°C, 120 rpm で 4 日間振とう培養する。フラスコの栓をとって香をかぐと, ピオーネはあまり良い香がしないが, カメリヤは特に良い香がした。酵母培養液を遠心管に入れ, 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し野生酵母が得られた。

2. 麦汁液体培地を用い前培養した酵母の培養

200 ml の蒸留水に Brix 8° になるまでマルトエキストラクトを溶かし, ブドウ糖 1g を加える。この培地を L 型試験管に 10 ml ずつ分注し, オートクレーブで滅菌する。斜面培地から分離酵母を植え付け, 振とう恒温槽で 27°C, 140 rpm, 3 日間振とう培養後, L 型試験管からメスピペットで 1ml ずつ培養液を採り, それぞれ L 型試験管と同じ培地 200 ml をいれ高圧滅菌した角付き三角フラスコに入れ, 27°C, 120 rpm で 4 日間振とう培養する。4 日後, 栓をとって香をかぐと, カメリヤ, 広大セレビジエは良い香がした。培養液を遠心管に入れ, 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し野生酵母が得られた。

表 1. 分離野生酵母のダーラム管発酵法, アインホルン管発酵法及び大量培養の結果

酵母の 記号	ダーラム管中 のガス量	アインホルン管 のガス量 (cm ³)	酵母の収量 (g)		培養酵母 の香
			麦汁培地	合成培地	
巨峰4-3-2	+	0.9	1.0		×
巨峰4-3-1	+	0.9	0.9		△
ピオーネ10-1	++	4.2	0.9		△
ポ-1-1	++	---		---	---
ポ-1-2	++	14.0	5.3	7.8	◎
ポ-2	+++	12.0		5.7	○
ポ-3	++++	13.0	6.3	6.8	◎
ポ-4-1	+++	14.5	5.8	6.6	◎
ポ-4-2	++	5.0		6.3	◎
フ-5-1	++	---		---	---
フ-5-2	++++	14.5	5.6	6.7	◎
ポ-7-1	+++	---		---	---
ポ-7-2	+++	5.3		7.2	◎
ポ-7-3	++	---		---	---
ポ-7-4	++++	14.0	5.4	5.0	×
ポ-8-1	++	---		---	---
ポ-8-2	+++	9.0		5.2	◎
ポ-8-3	+++	8.3		6.2	◎
ポ-8-4	++++	---		---	---
カメリヤ	++++	13.4		---	---

◎とてもよい, ○よい, ×よくない, --実施せず

酵母の利用に関する研究 (その1)

3. 改良麦汁液体培地を用い前培養し、振とう器を変えての酵母の培養

改良麦汁液体培地 (蒸留水 200 ml にマルトエキストラクト末 8 g, ブドウ糖 10 g を加え (Brix 7.5°), さらに酵母エキス 0.9 g, ペプトン 1.5 g を追加) を L 型試験管に 10 ml ずつピペットで分注し、オートクレーブで滅菌する。斜面培地から酵母を白金線を用いて植え付ける。振とう恒温槽で 27°C, 140 rpm, 3 日間振とう培養後, L 型試験管からメスピペットで 1 ml ずつ培養液を採り, それぞれ L 型試験管と同じ培地 200 ml あるいは合成培地 (ブドウ糖 10 g, ペプトン 1.5 g, 酵母エキス 0.9 g, アスパラギン 0.6 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g) をいれ高压滅菌した角付き三角フラスコに入れ, 27°C, 120 rpm で 4 日間振とう培養した。4 日後, 三角フラスコの栓をとって香をかぐと, すべての酵母が良い香がした。以上の結果を表 1 に示す。酵母培養液を遠心管に入れ, 2,500 rpm で 10 分間遠心分離し野生酵母が得られた。

パンの加工

1. ブドウから分離した酵母菌を使用したパンの加工 (その1)

(1) 材 料 (1 種類当たりの材料)

強力粉	100 g	砂 糖	10 g
食 塩	1 g	牛 乳	40 ml
卵	1/2 個	バ タ ー	12 g
酵 母	約 1 g		

(2) 加工と試食

酵母に牛乳, 砂糖ひとつまみを加え, 温め, 強力粉, 砂糖, 食塩に卵を加え, こね, 最後にバターを加え, 20分間よくこねる。生地になれふきんをかけ, 27°C, 40分, 一次発酵させる。まな板の上に粉をふりかけ, その上で生地を押しつぶしてガスをぬく。ぬれふきんをかけて, 30分間ねかし, その後 90 g ずつに分け, パンの形を作り, 細長い形のものを 2 つ作った。パン生地の香は, ピオーネ:あまり香がしない, カメリヤ:良い香, 広大セレビジエ:あまり良い香でないと感じた。

さらにぬれふきんをかけて, 27°C で 20 分間二次発酵させ, 表面によくといた卵をぬり, 180°C のオープンで 14 分間焼き, それぞれパンが得られた。カメリヤの焼き上がり体積に比べ, 天然酵母パンはやや小さかった。焼き上がりの香は, ピオーネ 1:特に良い香, ピオーネ 2, 4, 7:あまり良い香でない, カメリヤ:特に良い香, 広大セレビジエ:良い香であった。これらの結果を表 2 に示す。

表 2. 分離野生酵母の培養と焼き上がり天然酵母パンの体積及び香

酵母の記号	培養後の泡量	酵母の収量 (g)	酵母の香	焙焼パンの体積 (cm ³)	焙焼パンの香
ピオーネ 1	++	1.1	○	174	◎
ピオーネ 2	++	0.9	—	150	×
ピオーネ 4	+	1.1	—	110	×
ピオーネ 7	++	0.9	—	96	×
カメリヤ	++++	2.0	◎	198	◎
広大セレビジエ	+++	1.5	○	186	○

◎とてもよい, ○よい, ×よくない, —あまりなし

2. ブドウから分離した酵母菌を使用したパンの加工 (その2)

(1) 材 料 (1種類当たりの材料)

強力粉	100 g	砂 糖	10 g
食 塩	1 g	牛 乳	40 ml
卵	1/2 個	バター	12 g
酵 母	約 1 g		

(2) 加工と試食

酵母に牛乳, 砂糖ひとつまみを加えて温め, 強力粉, 砂糖, 食塩に卵を加え, こね, 最後にバターを加え, 20分間よくこねる。生地になれふきんをかけ, 27°C, 40分, 一次発酵させる。まな板の上に粉をふりかけ, その上で生地を押しつぶしてガスをぬく。ぬれふきんをかけて, 30分間ねかし, その後 90 g ずつに分け, パンの形を作り, 丸い形と細長い形を作った。

一次発酵後のパン生地の香は, ピオーネ: おいしいと感じる香がしない, カメリヤ: 大変良い香, 広大セレビジエ: あまり良い香でないと感じた。

さらにぬれふきんをかけて, 27°C で20分間二次発酵させ, 表面によくといた卵をぬり, 200°C のオーブンで15分間焼き, それぞれ天然酵母パンが得られた。焼き上がりの香は, カメリヤが特に良い香で, 他は香が良くなかった。カメリヤと比較すると, 焼き上がりの体積も少なく, 発酵がうまくいっていないと考えられる。これらの結果を表3に示す。

表3. 分離野生酵母の培養と焼き上がり天然酵母パンの体積及び香

酵母の記号	培養後の泡量	酵母の収量 (g)	酵母の香	焙焼パンの体積 (cm ³)	焙焼パンの香
ピオーネ10-1	++++	1.0	△	40	○
広大セレビジエ	++++	0.9	○	196	○
カメリヤ	+++	1.0	○	198	◎
巨峰4-3-2	+++	0.6	×	66	-
ピオーネ10-2	++	1.7	×	72	-
巨峰4-3-1	++	0.7	△	96	-

◎とてもよい, ○よい, -あまりない

3. 干しブドウから分離された酵母を用いたパンの加工 (その3)

(1) 培養分離野生酵母の遠心分離

麦汁培地または酵母増殖合成培地を用い, 27°C, 140 rpm, 4日間振とう培養し, 冷蔵庫で沈殿させた酵母を遠心分離器にかけ (5分/3,300 rpm) て, 5~7.8 g の酵母を得た。

(2) 材料 (1種類当たりの材料)

強力粉	200 g	砂 糖	20 g
食 塩	2 g	全 卵	25 g
バター	20 g	水	116 ml
酵 母	4.5~6 g (*酵母は11種類使用)		

(3) 加工と試食

(一次発酵) 強力粉, 砂糖, 食塩, 全卵, 酵母及び水を加え, よくこねる。15分後これにバ

酵母の利用に関する研究 (その1)

ターを加え、よくこねる。

生地になれフキンをかけ、28°C の孵卵器の中で1時間発酵させる。この生地をおしつぶしてガスをぬき、ぬれ布巾をかけ28°C の孵卵器の中で40分発酵させる。

(二次発酵) 約90g ずつの2個に分け、パンの形を整えたらぬれ布巾をかけて20分発酵させて200°C のオーブンで12分焼いた。

焼き上がりの天然酵母パンの香りはすべて大変強く、カメリヤよりも格段に強かった。焼き上がりの体積はカメリヤが一番大きく、柔軟であった。一般に天然酵母パンは、香りが大変良いが、菌ごたえのあるパンになる傾向があった。

表4. 分離野生酵母の培養と焼き上がり天然酵母パンの体積及び香

パンの番号	酵母の番号	アインホルン管のガス量 (ml)	使用酵母重量 (g)	焙焼パンの体積 (cm ³)	焙焼パンの香
1	ボ-8-2	9.0	4.4	480	◎
2	ボ-4-2	5.0	5.7	614	○
3	ボ-8-3	8.3	5.5	646	◎
4	ボ-7-2	5.3	6.0	620	◎
5	ボ-4-1	14.5	6.0	473	◎
6	ボ-7-4	14.0	4.4	373	◎
7	ボ-1-2	14.0	6.0	467	○
8	ボ-2	12.0	5.0	554	◎
9	フ-5-2	14.5	5.0	407	○
10	ボ-3	13.0	6.0	536	○
11	カメリヤ	13.4	5.0	775	◎
12	カメリヤ	13.4	5.0	773	◎

◎とてもよい, ○よい

考 察

1) ブドウ果実から野生酵母の分離について

市販ブドウ果実からブドウ酒を作る段階でシリコ栓を使用したため、酸素が入り、カビが生えた。カビを防ぐため酸素の出入りが少ない密栓ビンを使いカビの発生を防いだ。この結果、カビの発生も少なく、ブドウ酒酵母を分離できた。しかし、これら生ブドウ果皮付着酵母の発酵力は弱く、実用的で無かった。これはブドウが完熟しないまま出荷されているので、栽培農家特有の野生酵母が十分付着していないのが原因と推察される。

2) 天日乾燥干しブドウから野生酵母の分離について

天日乾燥干しブドウを密閉瓶中で発酵させても、カビの発生は防げなかった。しかし、エチルアルコール濃度を12.0, 5.6, 4.0%含む水を適量加え、密栓して発酵した場合にはカビの発生もなく、数多くの野生酵母が分離できた。この理由は、天日干しブドウはほぼ完熟した果実を収穫すること、天日干しなどその加工工程中に野生酵母が付着する機会も多く、野生酵母の宝庫となっているからと推定される。ただし、アルコール12%区分からは酵母が分離できなかったが、これは濃いアルコールの妨害により酵母が成長できにくかったためと考えられる。

3) 分離野生酵母を用いた天然酵母パンの加工について

ブドウ酒から分離し、大量培養した野生酵母の収量が少ない時は、パン加工での一次発酵がうまくいかず、そのため全体に固いパンになった。また、1次、2次の実験で分離した野生酵母よりも、市販パン酵母カメリヤの方が発酵力が強かった。分離された野生酵母の発酵力を知るためにも、それぞれの野生酵母大量培養に最適の培養用培地の選択を進めたい。

なお、天日乾燥干しブドウから分離された野生酵母の中には、一次発酵力も強く、香がよく、市販酵母カメリヤに匹敵する酵母（ポ-4-2、ポ-7-2、ポ-8-3）が得られた。また、パン酵母の発酵により膨らんだパンの体積と香は、発酵の度合いと密接に関連しており、発酵が進み体積が膨張するにつれて、香も良くなると推定される。

Summary

These experiments were carried out to bake breads fermented with the natural yeast obtained from grapes or raisins. Three of natural yeasts isolated from the fermentation solution of raisins were appraised high in that field of the natural yeast bread.

参 考 文 献

- 1) 日本経済新聞社編：日経バイオ年鑑 '97, pp 719-720, パン, 日本経済新聞社 (1997)
- 2) Marco：天然酵母パン, <http://www.skills.co.jp/~marco/koubo/> など多数
- 3) 好井, 金子, 山口編：食品微生物ハンドブック, 山口和夫, 酵母, pp 35~41, 技報堂 (1995)
好井, 金子, 山口編：食品微生物ハンドブック, 山口和夫, 製パンとパン酵母, pp 256~256, 技報堂 (1995)
- 4) 3M Canada Inc. : Interpretation guide Petrifilm Yeast and Mold Count Plate (1996)

—平成9年10月8日 受理—