

製パンに利用可能な野生酵母の探索

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 五十嵐 芽依

1年 大槻 果鈴

1年 櫻庭 彩佳

1年 小菅 心花

1年 西川 和佐

1年 渡邊 咲奈

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

助教 吉川 雄樹

1. 背景・目的

現代の我々日本人の食生活において、お米以外にもパンを食べる習慣が広がっており、もはや食卓に欠かせない存在になっている。パンは発酵食品の一種であり、小麦粉などの穀物粉、水や塩に酵母を添加することで生地を膨張させ焼き上げることで作られる。製パンにおいては、その性質から主に *Saccharomyces cerevisiae* という出芽酵母が用いられているが、酵母には様々な種類が存在し、食品それぞれによって適した種類の酵母が利用される。しかし、140年ほど前までは発酵食品の生産にどのような酵母が利用されているかということは分かっておらず制御することは容易ではなかった。それ以前においては、人々は食材に付着する酵母を独自の手法で増殖させ利用していたために、知らずも多様な酵母がパン作りを始めとした発酵食品生産に利用されていた⁽¹⁾。アルコール発酵に酵母が主要な役割を果たし、様々な種類の酵母が存在することが知られるようになってから現代にいたるまで、1300種類以上もの酵母が報告されている^(1,2)。我々は今まで利用されてこなかった酵母にもパン作りに適したものが存在するのではないかと考え、自然界から採取した酵母を用いて作ったパンの特徴を調べることで、「新たな製パン特性を示す酵母を見出す」ことを目的に本研究を実施した。

※報告書に記載できなかった結果等は私達が作成した自主研究 HP

(<https://sites.google.com/view/apu-srg-kobokobo/home>) にて報告しており、以下^(HP)と表記する。

2. 実験内容と結果

1-1) 自然環境から野生酵母の採取と生物種の特定

私たちは製パンに適した酵母を探索するため、秋田県内の竜ヶ森からは土壤試料、抱返り溪谷や小安峡・泥湯温泉、八郎湖のようにそれぞれ特徴の異なる水源から試料をそれぞれ採取し、これらの試料から酵母の単離を試みた^(HP)。採取した土壤および水源試料を表1に記載した培地にそれぞれ懸濁し、それぞれの栄養寒天培地に一定量の懸濁液を塗布した。寒天培地に塗布した残りの懸濁液は2日間30°Cで振盪培養し、菌体が増殖していることが確認できた場合は培養液を適当に希釈し、寒天培地に塗布した。菌体を塗布した寒天培地をインキュベーターにて2日間

30°Cで培養した後、カビや細菌を含む様々な菌体のコロニー形成が確認できた。これらのコロニーから酵母のコロニーのみを滅菌した爪楊枝を用いて新しい YPD 寒天培地に植え継ぎ、分離した^(HP)。

表1. 酵母の培養に用いた培地組成

Yeast extract, Peptone, Dextrose (YPD)		ラフィノース単一炭素源培地	
酵母エキス	10 g/L	Yeast Nitrogen base w/o a.a.	6.7 g/L
ポリペプトン	20 g/L	ラフィノース	20 g/L
グルコース	20 g/L	粉末寒天 ※1	20 g/L
粉末寒天 ※1	20 g/L	クロラムフェニコール	50 µg/ml
クロラムフェニコール	50 µg/ml	※1 寒天培地作成時のみ添加	

次に、分離した酵母をそれぞれ YPD 培地にて1晩 30°Cにて振盪培養した。培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 30 sec) して菌体を回収し、350 µl の Lysis Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁し、ガラスビーズ入りの 2 ml スクリューキャップチューブに懸濁液を移し、250 µl のフェノールクロロホルムを添加した後、ボルテックスミキサーにて1~2分間激しく懸濁した。その後、遠心分離 (13,000 rpm, 20 min) した上清を新しいチューブに移し、エタノール沈殿処理によりゲノムを含むサンプルを精製し、100 mM Tris-HCl (pH8.0) Buffer に懸濁した。RNase を 30°Cで 1 時間処理した後、再びフェノール抽出、エタノール沈殿処理によりサンプルを精製し、100 mM Tris-HCl (pH8.0) Buffer に懸濁することで、酵母のゲノムを含む DNA 試料を得た。この DNA 試料を鋳型とし、KOD FX Neo (TOYOBO) の推奨プロトコールに従い、リボソーム DNA の D1/D2 領域の塩基配列を特異的に増幅させるためプライマーセット (NL1, NL4) を使用して PCR を行った。PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動を行い、目的の塩基配列が増幅されている

ことを確認した後、エタノール沈殿法により精製し本学のバイオテクノロジーセンターにシーケンズ解析を依頼した。ここで得られた塩基配列を BLASTn にて解析し、塩基配列が一致したもの、またコロニー形成および顕微鏡観察結果の特徴^(HP)を参考資料⁽²⁾と照らし合わせた結果、それぞれの生物種を特定した (表 2)。

表2. 各採取場所から単離した酵母

場所	単離した酵母の生物種名	発酵能力	
泥湯温泉	温泉サンプルからは酵母が単離できなかった		
小安峡温泉			
竜ヶ森	土壌1	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	なし
	土壌2	バクテリア・カビのみ	
	土壌3	<i>Lachancea meyersii</i>	あり
		<i>Sporobolomyces albidus</i>	なし
土壌4	<i>Lachancea meyersii</i>	あり	
抱返り溪谷	水源	<i>Candida solani</i>	あり
八郎瀧	水源1	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	なし
	水源2	<i>Candida pseudolambica</i>	あり
		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	なし

参考資料⁽²⁾に記載されている情報から、取得した酵母の半数は発酵能を有していない事が分かった。また発酵能を有すると報告のある *Lachancea meyersii* 以外の 2 種類の酵母も培養液から発酵臭が感じ取られず、製パンへの利用が可能と思われる酵母は一種のみであった。

1-2) 家庭のレシピを利用した野生酵母の採取と生物種の特定

そこで発酵能を有する酵母を効率的に取得したいと考えた我々は、家庭で用いられている「自家製天然酵母」の作成レシピに着目した。すでに多くの人々が独自に取得した酵母を用いて製パンに利用しているため、この時取得できる酵母は発酵能を有するものであると考え、研究グループメンバー各自でフルーツ酵母液を作成した^(HP)。フルーツには梨、キウイ、ブドウ (デラウェア、

ピオーネ)、ブルーベリー、ブルーを用いた。まず細かく刻んだフルーツや皮付きのままのフルーツをビンに入れ、表面全体に行き渡るように砂糖をまぶした。フルーツ全量が浸るくらいの水を加えた。その後4日間ほど、常温で静置し、酵母液中に炭酸ガスの発生を確認できた際のビンの底の澱を採取し、抗生物質を含む YPD 寒天培地に塗布した。その後は前述した手法と同様に酵母を分離し、生物種をそれぞれ同定した(表3)。得られた酵母はいずれもアルコール発酵能を有していることがこれまでに報告されていた⁽²⁾。

表3. フルーツ果皮から単離した酵母

単離した酵母の生物種名	発酵能力
<i>Candida oleophila</i>	あり
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	あり
<i>Pichia kluyveri</i>	あり
<i>Pichia terricola</i>	あり

2) 製パン試験と官能評価

本研究で得られた野生酵母の製パン試験を行う上で、一般家庭でのレシピを参考に、酵母の使用量を検討した^(HP)。条件検討の結果から、酵母懸濁液の濁度 OD=40 で製パンを行うことが妥当だと判断し、これに従い以下の製パン試験を実施した。最終的な製パン試験には、*S. cerevisiae*、*Lachancea meyersii*、*Hanseniaspora uvarum* をそれぞれ用いた。これらの酵母を 200 ml の YPD 培地にて 30°C で 2 晩振盪培養し、培養液を遠心分離し、培養上清を捨て、蒸留水で洗浄した後、それぞれ蒸留水に再懸濁したその後 OD=40 になるよう調整したものを酵母液として製パンに供した。※製パンは家庭用ホームベーカリー SD-BT103 (National) に、表4の材料を投入した後、「天然酵母メニュー」の「食パン」プログラムを実施した。焼き上げたパンの発酵具合などは断面や、パン生地膨らみを測定して評価した。また、パンの香り、食感、パンの水分、塩味、甘み、総合的な味という6つの観点から我々が設けた基準ののっとり6人の評価者によって評価した(図2)。

表4. 製パンの材料

小麦粉 大潟村産「銀河のちから」	134 g
塩	2.2 g
上白糖	8 g
田沢湖養蜂場はちみつ(アカシア)	8 g
バター	10 g
牛乳	22 g
生クリーム	34 ml
酵母液	50 ml

上記で示した野生酵母を用いてそれぞれ製パンしたところ、*S. cerevisiae* を用いたパンは生地が破裂してしまい、*L. meyersii* のパン生地が *H. uvarum* よりも大きく膨らんでいた(図1)。官能評価の結果としては *S. cerevisiae* を用いたパンは硬い食感で、塩味が強く感じられた。また、*L. meyersii* では香りが強く、非常に柔らかい食感を示した。そして *H. uvarum* は強い甘みを感じるという結果が示された。総合的な味の評価にて、*S. cerevisiae* と比較して野生酵母の方が高い評価が示された。

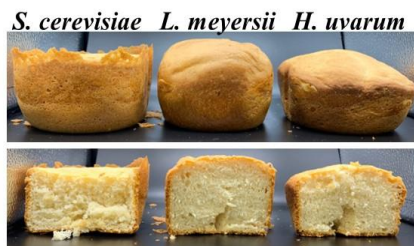


図1. 各酵母の製パン結果

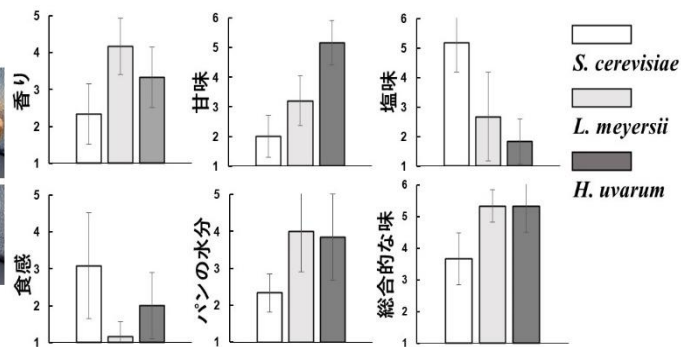


図2. 官能評価結果

3. まとめと考察

本研究では秋田県内の水源・土壌の採取およびフルーツからの採取により、合計 11 種類 26 株の酵母を取得した。さらに、この内発酵能を有する 7 種類の酵母の中から条件検討の結果^(HP)を踏まえて *L. meyersii*、*H. uvarum* を選択し、ドライイースト由来の *S. cerevisiae* の合計 3 種類の酵母を用いて製パン試験を行った。

水源・土壌試料において、水源試料からはほとんどコロニーが得られず、逆に土壌においてはカビ・バクテリアを含むコロニーの形成が多く見られた^(HP)。この結果は土壌に菌類が生息するのに必要な栄養源が豊富に存在している、水源ではそれが限られていることが原因だと考えられた。このことから、土壌試料から探索を行うことでより多くの種類の酵母を発見することが期待できる。ただ、自然界からの酵母の採取では「発酵能を有する」ものとそうでないものがどちらも採取されるため効率が高い手法であるとは言い難い。実際に私たちが取得した酵母の半数以上は発酵能を持たない酵母だった。一方で自家製酵母レシピを参考にした採取法では、取得した酵母はすべて発酵能を有していた。自家製酵母レシピでは酵母が発酵するのに適した環境で酵母が増殖するのを待ち、酵母液中で発酵が確認できてから液中の澱を採取するため、理に適った手法であると思われる。また今回はフルーツから酵母を単離したが、本手法は他の単離源からでも発酵能を有する酵母の取得に利用することが可能だと期待される。

製パン試験において、同じ量の菌体を製パンに使用したにもかかわらず、*S. cerevisiae* を用いた食パンは発酵中に生地が破裂してしまった。この結果は *S. cerevisiae* が他の野生酵母と比較しても発酵力が顕著に高いことを示しているが、官能評価の結果には大きくマイナスの影響を及ぼし、総合的な味の評価が野生酵母よりも劣る結果となった。さらに、*S. cerevisiae* のパン生地が最も硬いと判断された原因は、生地が破裂したことで炭酸ガスによって生地内に形成された空洞が押し潰されてしまったことが原因だと考えられる。*L. meyersii* は *H. uvarum* よりも生地が膨らみ、パン生地内の気泡が大きく、多くの空気が含まれたために最も柔らかいと判断されたのだと考えられる。このことから、生地の発酵が進めばその分柔らかい食感を持たせられるが、発酵が強すぎれば生地が破裂し、食感や味に大きくマイナスの印象を与えてしまうため、製パンにおいて使用する酵母の量が非常に重要であることが分かった。また *H. uvarum* は他の 2 つの酵母と異なり、麦芽糖やショ糖は利用できない⁽²⁾。そのため他の 2 つの酵母を利用した際に消費された糖が *H. uvarum* を用いたパン生地内には残ったままであると予想され、これが強い甘みを示した要因だと考えた。*H. uvarum* が発酵可能なのはブドウ糖と果糖のみであるため、原材料のはちみつにはブドウ糖や果糖も多く含まれることから⁽³⁾、これらの糖を発酵に利用したと思われる。

本自主研究の結果から、それぞれの酵母の特徴が食感や甘味にも大きく影響するため、製パン時に求める味や発酵加減によって酵母を使い分けることで *S. cerevisiae* には出せない特徴の製パンも可能であることが示された。

参考文献

1. 発酵食品の歴史:ビール、パン、ヨーグルトから最新科学まで. (2021).
2. The Yeasts a Taxonomic Study 5th edition. (2011).
3. Muhammad Faiz Zulkifli *et al.*, *J Evid Based Integr Med.* (2022).