パンに高い防カビ効果を付与する製パン用発酵風味液の開発

仲田弘明¹・今井奈津夫²・長谷川秀樹¹・田村雅彦²

(¹ 日本甜菜製糖株式会社 総合研究所, ² 日本甜菜製糖株式会社 清水バイオ工場)

平成 25 年 1 月 17 日受理

Development of fermented seasoning with antifungal effects on bread.

Hiroaki NAKATA¹, Natsuo IMAI², Hideki HASEGAWA¹, and Masahiko TAMURA²

(¹Research Center, Nippon Beet Sugar Mfg. Co., Ltd., Nishi 13, Minami 9-sen, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-0831, Japan.

²Shimizu Bio Factory, Nippon Beet Sugar Mfg. Co., Ltd., 53 Dai 2-sen, Aza-Shimizu, Shimizu-cho, Kamikawa-gun, Hokkaido 089-0103, Japan)

Fermented seasoning for breadmaking was developed. Using sucrose as a main material, lactic acid bacteria (*Lactobacillus buchneri*) and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were cocultivated since antifungal compounds (organic acid and ethanol) were produced by both microbes. After fermentation, both microbes were sterilized, discarded by centrifugation, and a clear supernatant was obtained as a fermented seasoning. Antifungal assay showed that addition of the fermented seasoning to bread was effective in inhibiting germination in *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurescens* and especially *Cladosporium cladosporioides*. The bread also was sweet, with umami, sour, moist and suppressed the smell of the flour. Moreover, the fermented seasoning had a softening effect on meat. This seasoning was named "LACTO-ZUCK[®]" and subsequently commercialized.

Key words : 発酵風味液, 共培養, 防カビ効果, 官能検査, 肉軟化効果

緒 言

発酵風味液とは、原料を乳酸菌や酵母により発酵させた発酵液の呼称であり、主にパン業界において製パン資材として使用される。現在市販されている発酵風味液の発酵原料は小麦粉、乳製品、果実など多岐にわたっており、その風味もバラエティに富む。発酵風味液の添加効果としては、パンに独特の好ましい風味を付与すること¹⁾や、パンの物性改善効果²⁾などがある。

近年では風味の付与などの他に、パンのカビ発生遅延効果（以下、防カビ効果）を有する発酵風味液への需要が高まっている。パン業界における防カビ剤としては酢酸ナトリウムやソルビン酸カリウムなどが使用されており、これらは食品添加物に指定されている^{3,4)}。

一方、発酵風味液は食品添加物に該当しないため、食品添加物の使用を嫌うユーザーにとって重宝されている。

これまで著者らは防カビ効果を有するサワーブレッドの研究⁵⁾などを行ってきた経緯にあるが、昨今の需要を鑑み、パンに防カビ効果を付与する発酵風味液の開発に着手することとした。培養を行うにあたり、防カビに効果のある有機酸およびエタノールを豊富に含有させるため、乳酸菌と酵母による共培養の手法を取り入れた。

また、製パン資材以外の応用用途も視野に入れ、みりんや酢のような透明感のある外観を目指すこととした（ほとんどの市販発酵風味液は小麦粉などの不溶性原材料を使用しており、濁りや沈殿を生じている）。

著者らは砂糖と可溶性の酵母エキスのみを原材料とし、さらに発酵終了後に菌体を遠心除去することで透明感を出した。このことは、発酵風味液を使用する際の沈殿均一化作業（攪拌作業）の省略にも繋がるため、使用者の作業負担が軽減されと考えられた。

上記の通り開発された発酵風味液を用いてパンを焼成し、防カビ試験および官能検査を実施した。さらに応用として肉軟化効果を見出したので、その詳細を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

乳酸菌の供試菌株として、北海道のサイレージより取得されたヘテロ乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* を試験に供した。本菌株は培養液中に高濃度の乳酸、酢酸を生成することが明らかとなっている⁶⁾。また本菌株は、諸国のサワー種⁷⁾やモンゴルの伝統的発酵乳⁸⁾などの発酵食品から分離された報告例があり、広く食経験のある乳酸菌である。株式会社オリジン生化学研究所では、ふなずしから分離された本菌株を粉末（殺菌菌体）および食品加工用乳酸菌（生菌）として供給している⁹⁾。

一方、酵母の供試菌株として市販パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（日本甜菜製糖、MP イースト）を使用した。本菌株は、パン生地中に高濃度の有機酸やエタノールを蓄積する特徴を有することから、発酵風味液を製造する際においても培養液中にこれら防カビに効果のある物質を多量に生成することが期待された。

2. 培養

乳酸菌と酵母の前培養培地および本培養培地の組成として、グラニュ糖 200 g/L（日本甜菜製糖）および酵母エキス 25 g/L（LEVAPAN S. A.）を使用し、pH6.5～7.0 に調整したのち加熱殺菌し試験に供した（以下、風味液培地）。

乳酸菌の前培養として、プレート上に生育した乳酸菌菌株 1 白金耳を 6 ml 風味液培地に植菌し、35℃で 3 日間静置培養を行った。これを 60 ml 風味液培地に全量植菌し、35℃で 3 日間静置培養を行い乳酸菌前培養液とした。

酵母の前培養として、斜面培地上に生育した酵母菌株 1 白金耳を 6 ml 風味液培地に植菌し、150 rpm、30℃で 12 時間振盪培養を行った。これを 60 ml 風味

液培地に全量植菌し、110 rpm、30℃で 12 時間振盪培養を行い酵母前培養液とした。

本培養は、10 L 容ジャーファーマンターに風味液培地 6 L を張り込み実施した。加熱殺菌後の風味液培地 6 L に対し乳酸菌前培養液 66 ml を全量植菌し、80 rpm、35℃で一晩培養を行った。翌日、乳酸菌によって生成された有機酸により pH5.0 まで低下したところで酵母前培養液 66ml を全量植菌し、引き続き 4 日間培養を継続した。分光光度計（日本分光、Ubest-30）を用い、乳酸菌および酵母の生育を濁度（OD₆₆₀）として経時的に測定した。

培養終了後、乳酸菌および酵母を死滅させるために 80℃で 1 時間加熱殺菌したのち、白塩を終濃度で 15 g/L となるよう添加した。その後、遠心分離機にて 8,000 rpm、5 分間遠心分離して死菌体をはじめ固形分を除去し、上清を発酵風味液として得た。

3. 発酵風味液の成分分析

乳酸（D-乳酸と L-乳酸の合計）および酢酸含量の測定は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、名倉らの手法¹⁰⁾を参考に分析した。カラムに Shodex Ionpak KC-811×2（昭和電工）を使用し、溶離液（2 mM 過塩素酸溶液、流速 1 ml/min）および反応液（0.2 mM プロモチモールブルー、15 mM Na₂HPO₄・12H₂O、2 mM NaOH、流速 0.5 ml/min）を用い、カラム温度 45℃、検出器 L-7400（波長 445 nm、日立製作所）にて実施した。

エタノール含量の測定は同じく HPLC により、カラムに Shodex SUGAR KS-801（昭和電工）を使用し、溶離液（0.05 mM NaOH、流速 1.0 ml/min）、カラム温度 80℃、検出器 RID-10A（島津製作所）にて実施した。

4. 製パン手法

日本イースト工業会の製パン分析手法¹¹⁾に従い、食パン中種法にて、混捏、分割、成形、焼成しプルマン型の食パンを作製した。発酵風味液無添加のパン（一般的な食パンに相当）について、中種時の配合は強力粉クイン（日本製粉）70%、MP イースト 2%、フード 0.1%、水 40%で行い、本捏時の配合は強力粉クイン 30%、砂糖 5%、食塩 2%、ショートニング 5%、水 25%で配合を行った。一方、発酵風味液パンは風味液の添加量 1.5%、3%、4.5%にて実施し、添加量の分だけ水、食塩を減らして本捏時に添加した（単位%

は強力粉を 100%とするパーカーズパーセントに基づく)。

5. パン成分抽出液の作製および分析

焼成後のパンを厚さ 1.9 cm にスライスし、クラム部 25 g に対し水 75 ml を加えブレンダーにて破碎後 (30 秒×3 回)、200 ml にメスアップし室温にて 1 時間放置し、パン中に含まれる成分の抽出を行った。その後、遠心分離機により上清を回収し、濾紙にて濾過した溶液をパン成分抽出液とした。この溶液について、pH および酸度 (遊離有機酸総量) を測定した。清酒における分析法を参考に¹²⁾¹³⁾、パン成分抽出液 10 ml を 1/10 規定の水酸化ナトリウム溶液で pH7.0 まで中和した時の滴定 ml 数を酸度とした。

6. 防カビ試験

Aspergillus niger NBRC4414 (和名:クロコウジカビ)、*Cladosporium cladosporioides* NBRC4459 (和名:クロカワカビ) *Penicillium purpurescens* NBRC5685 (和名:アオカビ)、の孢子懸濁液 10 μ l (孢子数 20 コ/10 μ l) を焼成後のパン 1 スライスあたり 25 箇所接種し、ビニール袋で密封したのち 25℃ で数日間培養を行った。数時間おきに目視による観察を行い、コロニーの着色が確認された段階をカビ発生と見なした。以下の式により、カビ発生率を算出した。

$$\cdot \text{カビ発生率} = \text{カビ発生箇所数} / 25 (\text{総接種箇所数}) \times 100 (\%)$$

7. 官能検査

訓練された 28 名 (男性 17 名、女性 11 名) により、各項目 (甘味、旨味、酸味、しっとり感、粉臭) について「弱い 1 点、やや弱い 2 点、普通 3 点、やや強い 4 点、強い 5 点」の配点にて集計を行った。

8. 肉軟化効果の調査

厚さ 1 cm にスライスされた牛もも肉 (オーストラリア産) 約 250 g をチャック付きのビニール袋に入れ、発酵風味液 500 ml に漬け 4℃ で一晩放置した。一方、漬け込みを行わない試験区を無浸漬 (対照区) とした。その他、水浸漬、日本酒 (天、宝酒造) 浸漬の試験区についても設け、発酵風味液浸漬と同一の方法にて漬け込みを行った。日本酒浸漬の試験区については、発酵風味液と同等のエタノール濃度 (約 7%) および白塩濃度 (15 g/L) となるよう、水による希釈および白塩の添加を行った。

浸漬後の肉を 95℃ 以上の熱湯で 2 分間茹でたのち

室温まで冷まし、Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems) にて軟化測定試験を行った。プローブとして Fracture wedge set を用い、プローブ移動速度 5 mm/s、移動距離 12 mm の条件にて切断を行った。それぞれの試験区について、8 反復で試験を行った。切断時にかかった力 (N) の最大値を集計し、エクセル統計 2008 にて統計処理を行い、Tukey の方法により有意差の検定 ($p < 0.05$) を行った。

実験結果および考察

ジャーファーメンターによる培養の結果を示す (Fig. 1)。乳酸菌前培養液を植菌後、乳酸菌により生成された有機酸 (乳酸、酢酸) の影響を受け pH の低下が確認された (培養 0~12 時間後)。pH5.0 まで低下した段階で (培養 18 時間後)、酵母前培養液を植菌し引き続き培養を継続した。酵母植菌直後からエタノールが急速に生成され、また乳酸菌と酵母により有機酸も順次生成された (培養 18~120 時間後)。乳酸菌の生成する有機酸により培養液 pH を低下させて雑菌汚染を防止したのちに酵母を培養する手法は、清酒製造における生醗系酒母の製造方法¹⁴⁾より着想を得ている。

培養終了後の培養液は、乳酸菌と酵母の死菌体や少量残存する固形分により濁りを生じていたが、これらを遠心分離により除去することで、酢のような黄色みがあった透明色の上清を発酵風味液として得ることが出来た (黄色は酵母エキスの色素に由来すると考えら

Fig. 1 Time course of the fermentation. ○Lactic acid (g/L); ●Acetic acid (g/L); △Ethanol (% v/v); ▲Growth (OD₆₆₀); □pH.

れた)。発酵風味液の成分分析値は、pH3.46、乳酸11.6 g/L、酢酸7.5 g/L、エタノール7.1% (v/v) であった。

発酵風味液を用いてパンを焼成したのちパン成分抽出液を作製し、分析を行った。発酵風味液の添加量を上げるに従い pH の低下と酸度の上昇が確認されたことから、発酵風味液中の有機酸（主に乳酸、酢酸）が正しくパンに持ち込まれたと考えられた (Table 1)。なお、発酵風味液を添加することによる製パン作業への悪影響（ホイロ時間の遅延、生地のかたつきなど）は特に見られなかった。また、適量の酢酸はパンの老化度を低下させ、一方で過剰量の酢酸は老化を進行させることが知られているが¹⁵⁾、発酵風味液の添加の有無および添加濃度の違いで老化速度に差は見られなかった。

焼成後のパンを用い、防カビ試験を実施した (Fig. 2)。発酵風味液の添加量を上げるに従い、カビ三種類とも抑制効果が確認された。中でも *C. cladosporioides* に対しては極めて高い防カビ効果を発揮し、3%添加で2日程度のカビ発生遅延が確認され、4.5%添加では一週間経過後もカビの発生がほとんど確認されなかった。防カビ効果の主たる要因として、パン中の有機酸含量

と pH との関係が考えられた。すなわち、低 pH 下では酸解離定数が高い有機酸ほど非解離型分子の割合が高く、この非解離型分子は親油性のため細胞膜の透過性が高いので細胞に障害を与えることにより抗菌性を示す¹⁶⁾。乳酸単独ではカビなどの真核生物に対する抑制効果はほとんど無いとされるが、乳酸がパンの pH を低下させる¹⁷⁾ ことにより高い防カビ効果を示す非解離型酢酸の分子割合が増えるため、結果として乳酸、酢酸とも防カビ効果に寄与していると考えられた。また、有機酸以外の防カビ効果要因として、発酵風味液に含まれるエタノールが作用している可能性についても考えられた。

発酵風味液添加パンの官能検査を実施した (Fig. 3)。発酵風味液の添加濃度を上げるに従い、各項目について段階的な増加および減少傾向が確認された。甘味の増加は、乳酸菌および酵母が資化しきれず発酵風味液中に残存する糖に由来すると考えられた。旨味の増加は、乳酸菌や酵母により生成されたと推測されるアミノ酸などの物質に由来すると考えられた。今後、発酵風味液中のアミノ酸含量についても調査を実施予定である。酸味の増加は、乳酸菌や酵母により生成された有機酸（乳酸および酢酸）に由来すると考えられた。

Table 1 Bread extract pH and acidity using the fermented seasoning

Use of fermented seasoning (%; Baker's percentage)	Bread extract pH	Bread extract acidity
0%	5.00	0.140
1.5%	4.91	0.155
3.0%	4.81	0.175
4.5%	4.72	0.195

Fig. 2 Antifungal effects on the bread. Use of fermented seasoning :
○0%; ●1.5%; △3%; ▲4.5% (%; Baker's percentage).

有機酸はパンの風味向上に寄与することが知られており、例えばサワー種を用いたパンの場合、乳酸はまろやかさを作り、酢酸はシャープな酸味を作ることが知られている¹⁸⁾。その他、しっとり感の増加や粉臭（小麦粉臭）の低減（マスキング効果）についても傾向が確認された。以上の結果より、発酵風味液の添加は一般的にパンに良いとされる風味や効果をもたらすことが示された。

先述の通り、発酵風味液には乳酸、酢酸、エタノールが豊富に含まれているため、これら含有物質がパン以外の食品にもポジティブな効果をもたらす可能性が考えられた。そこで、肉軟化効果について調査を行うこととした。牛もも肉を各々の溶液に一晩浸したのち茹で、切断時にかかる力（N）の最大値を測定することにより軟化効果の検証を行った（Fig. 4）。まず無浸

漬と水浸漬を比較すると、ほとんど差が見られなかったことから、水自体には肉軟化効果が無いことが示された。また、無浸漬と日本酒浸漬を比較すると、日本酒浸漬の方が平均値が若干低かったため日本酒はある程度の肉軟化効果を有すると考えられたが、有意差は見られなかった。一方、無浸漬と発酵風味液浸漬を比較すると、有意差（ $p < 0.05$ ）が確認されたことから、発酵風味液は一定の肉軟化効果を有することが示された。山口、田畑の報告¹⁹⁾によると、食酢は濃度が高いほど肉軟化効果が見られ、アルコール飲料はエタノール濃度 5%～10%の範囲で肉が最も軟らかくなるとある。発酵風味液は乳酸濃度 11.6 g/L、酢酸濃度 7.5 g/L、エタノール濃度 7.1%であるため、これらの効果により肉が軟化したと推測された。

その他に期待される効果として、例えばみりん中に

Fig. 3 Sensory analysis by a panel of 28 tasters, 17 men and 11 women(%; Baker's percentage).

Fig. 4 Softening effect on meat. Control, not immersed; Water, immersed in water; Sake, immersed in sake adjusted to 7% ethanol and 15 g/L NaCl(the same as fermented seasoning); Fermented seasoning, immersed in fermented seasoning. Each value is the means $\pm$ SE ($n = 8$). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

含まれる有機酸には甘ったるさの引きしめ効果や味の緩衝作用が、アルコール類には煮崩れ防止作用や悪臭を揮散させる作用²⁰⁾があるため、今後これらの効果についても検証を行う予定である。また、著者らの発酵風味液はみりんや酢とは全く異なる風味、香りを持つことから、従来にはない新たな味、香りを消費者に提供できる可能性がある。

これらの結果より、著者らの開発した発酵風味液は産業上有用であると判断されたため、今回得られた知見を元に商業生産を行い、商品名「ラクトザック[®]」として上市するに至った。今後、製パン資材にとどまらず様々な食品に応用されることを期待している。

要 約

近年需要が高まっている防カビ効果に焦点を当て、製パン資材用の発酵風味液の開発を行った。乳酸菌 *L. buchneri* とパン酵母 *S. cerevisiae* の共培養により砂糖を主原料として培養を行い、防カビに効果のある有機酸およびエタノールを豊富に含有させた。また、培養終了後に菌体を遠心除去することで透明感を出した。

防カビ試験の結果、発酵風味液添加パンは三種類のカビで高い防カビ効果を示し、中でも *C. cladosporioides* に対して極めて高い効果を示した。また官能検査の結果、発酵風味液添加パンは甘味、旨味、酸味、しっとり感が増加し、粉臭のマスクング効果についても確認された。さらに製パン資材以外の応用用途として、肉軟化効果を見出した。

以上の結果より、著者らの開発した発酵風味液は産業上有用であると判断されたため、商品名「ラクトザック[®]」として上市するに至った。

謝 辞

肉軟化効果を調査するにあたりご指導を頂きました、財団法人十勝圏振興機構食品加工技術センターの四宮紀之主任研究員に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 三浦芳助, 玉井正弘: New Food Ind, **38**, (12), 29-37 (1996)

- 2) 三浦芳助, 玉井正弘: 広島女学院大学論集, **48**, 183-189 (1998)
- 3) 第8版食品添加物公定書厚生労働省復刻版 (日本食品添加物協会, 東京), 363 (2007)
- 4) 第8版食品添加物公定書厚生労働省復刻版 (日本食品添加物協会, 東京), 460-461 (2007)
- 5) 仲田弘明, 長谷川秀樹, 櫻井博章, 田村雅彦: 日本食品科学工学会誌, **57**, (2), 85-90 (2010)
- 6) 仲田弘明, 長谷川秀樹: 日本イースト工業会技術報告, **81**, 1-8 (2011)
- 7) De Vuyst L., and P. Neysens: *Trends Food Sci. Technol.*, **16**, 43-56 (2005)
- 8) J. Yu, W. H. Wang, B. L. G. Menghe, M. T. Jiri, H. M. Wang, W. J. Liu, Q. H. Bao, Q. Lu, J. C. Zhang, F. Wang, H. Y. Xu, T. S. Sun, and H. P. Zhang: *J. Dairy Sci.*, **94**, (7), 3229-3241 (2011)
- 9) 乳酸菌の利用技術と市場 (株式会社シーエムシー出版, 東京), 133 (2010)
- 10) 名倉泰三, 清水洋介, 佐山晃司, 辨野義己: ビフィズス, **9**, 151-159 (1996)
- 11) 日本イースト工業会編, 日本イースト工業会技術報告第60号, (日本イースト工業会, 東京), 97-98 (1991)
- 12) 注解編集委員会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京), 20-23 (1993)
- 13) 醸造の事典 (株式会社朝倉書店, 東京) 225-226 (1998)
- 14) 東和男編, 発酵と醸造 [II] (株式会社光琳, 東京), 17-19 (2003)
- 15) 池田俊幸, 杉田康一郎, 隈丸潤, 佐野稔, 江口一徳: Pain, **9**, (48), 8-11 (2001)
- 16) 食品危害微生物ハンドブック (株式会社サイエンスフォーラム, 東京), 368-370 (1998)
- 17) 安田隆弘: Pain, **9**, (56), 44-47 (2009)
- 18) ジェフリーハメルマン, BREAD (株式会社旭屋出版, 東京), 348-353 (2009)
- 19) 山口務, 田畑智絵: 北陸学院短期大学紀要, **36**, 107-117 (2005)
- 20) 東和男編, 発酵と醸造 [II] (株式会社光琳, 東京), 373-374 (2003)