

報 文

パン生地における発酵特性及び冷凍耐性に対するトレハロースの機能評価

福永千文, 島 純

食品総合研究所 酵母研究室

The function of trehalose addition on fermentation properties and freeze tolerance in dough

Chifumi FUKUNAGA and Jun SHIMA

Yeast Laboratory, National Food Research Institute

Abstract

Frozen-dough technology has been accepted due to its advantages, which include supplying oven-fresh bakery products to consumers and improving labor conditions for bakers. Ordinary commercial baker's yeast is generally susceptible to damage during frozen storage and does not retain sufficient leavening ability after frozen storage. We hypothesized that addition of trehalose, which was known as a possible cryoprotectant, to dough should decrease freeze damage. In this study we attempted to determine effects of trehalose addition to white bread dough and sugar dough on fermentation ability and freeze tolerance. We showed that trehalose addition affected to fermentation ability but not to freeze tolerance in sugar dough. On the other hand, trehalose addition to white bread dough affected to freeze tolerance but not to fermentation ability.

(Received Oct. 30, 2002; Accepted Feb. 5, 2001)

緒 言

冷凍生地製パン法は生産者および消費者にとって大きなメリットを提供する新規な製パン法である。本製パン法では、生地を冷凍することにより製パン工程を一時中断することを可能にする²⁾。このことにより、長時間連続労働の軽減化及び消費者への焼き立てパンの提供がはかれる。冷凍生地製パン法における問題点は、発酵過程のパン生地の冷凍により生じるパン酵母の冷凍傷害である²⁾。すなわち、冷凍中にパン生地中のパン酵母が傷害を受け、解凍後の最終発酵において発酵力

及び膨張力の著しい不足が生じる。

冷凍傷害の問題に対して、我々の研究グループは生地の冷凍中でも傷害を受けにくい「冷凍耐性パン酵母」の開発を介して解決を試みてきた³⁾⁻⁵⁾。自然界から単離した冷凍耐性パン酵母は、通常のパン酵母と比較して2糖類の一種であるトレハロースが多量に蓄積すること等から、冷凍耐性を決定付ける因子のひとつが細胞内に蓄積されるトレハロースであることを明らかにした³⁾⁻⁴⁾。また、我々はパン酵母のトレハロース分解酵素（トレハラーゼ）をコードする遺伝子を破壊することにより、人為的に細胞内トレハロース量を上昇させた冷凍耐性パン酵母の開発にも成功している⁴⁾。

冷凍耐性酵母の開発は冷凍生地製パン法の実現にとって重要な進歩となった。しかし、新規な冷凍耐性パン酵母の開発には膨大な作業が必要であり、また、得られた冷凍耐性パン酵母が全てのパン生地に対して有効ではないケースも多い²⁾。そこで、本研究では、通常のパン酵母を用いた場合でも、冷凍傷害を防ぐことができる有効な手法を開発することを目的に研究を開始した。最近になり、トレハロースの安価な微生物的製造方法が開発され、食品素材としての利用が可能になった⁶⁾。そこで、パン生地へ直接的にトレハロースを添加することにより、冷凍生地中のパン酵母の冷凍傷害の低減化がはかれる可能性を想定した。パン生地の発酵の過程でパン酵母がもともと有していた細胞内トレハロース量が劇的に低下し、それにともない冷凍耐性も低下する。したがって、パン生地にトレハロースを添加することにより、パン酵母細胞内のトレハロース含量の低下が妨げられ冷凍耐性の低下が防止できるのではないかと考えられる。

パン生地は含まれるショ糖の含量により、その生地の性質が異なる。ほとんどショ糖を含まない無糖生地はフランスパン等の製造に、5%程度のショ糖を含む低糖生地は食パン等の製造に、10-40%の大量のショ糖を含む高糖生地は菓子パン等の製造に用いられる。糖質を含まないことを前提とした無糖生地へのトレハロースの添加は、本来の無糖生地の特質を損なうことにもなりかねないので、本研究では高糖生地および低糖生地に種々の濃度でトレハロースを添加して、発酵特性及び冷凍耐性に対する影響について詳細な解析を行った。

実験方法

1. 実験材料及び測定器具

製パン試験には、以下の材料を用いた。パン酵母は市販のオリエンタル酵母工業社製(製パン・製菓用酵母)、トレハロースはシグマ社製、小麦粉(強力粉)はカメリヤ粉(日清製粉)を用いた。ショ糖は日本甜菜製糖社製、食塩は和光社製を用いた。パン生地の膨張力試験には、ATTO社製の膨張力測定用メスシリンダーを用いた。発酵力の測定はATTO社製のFermograph IIを用いた。パン容積の測定はASTEX社製の3D Laser Scannerにより行った。

2. 高糖生地製パン試験

高糖生地の組成は小麦粉100g, 食塩 0.5g, 水 54ml, パン酵母 4gの組成にトレハロース及びショ糖を合計30%

になるよう図表中に記載した比率で添加した⁸⁾。ピンミキサー(National社製)を用いて30℃で3分間、混捏した。一次発酵は30℃で60-120分間行った。その間の発酵力を炭酸ガス発生量としてFermograph IIにより、膨張力をメスシリンダー試験により測定し発酵特性の指標とした⁷⁾。冷凍耐性の評価は以下のように行った。一次発酵を30℃, 60分行った後、-20℃にて冷凍した。1週間の冷凍保存後、室温で解凍し、解凍後の発酵力及び膨張力を測定し、冷凍耐性の指標とした。また、同様の過程で発酵を行った後、パン生地を200℃で15分間焼成し、焼成したパンの容積および色相を観察した。

3. 低糖生地製パン試験

低糖生地の組成は小麦粉100g, 食塩 2g, 水 54ml, パン酵母 4gの組成にトレハロース及びショ糖を合計5または10%になるよう図または表中に示す比率で添加した⁷⁾。ピンミキサー(National社製)を用いて30℃で3分間、混捏した。一次発酵は30℃で60-120分間行った。その間の発酵力を炭酸ガス発生量としてFermograph IIにより、膨張力をメスシリンダー試験により測定し発酵特性の指標とした⁸⁾。冷凍耐性の評価は、200℃での焼成時間を25分間とした以外は高糖生地製パン試験と同様である。

実験結果及び考察

1. 高糖生地発酵に与えるトレハロース添加の効果

まず菓子パン等に用いられる高糖生地に対するトレハロースの効果を検査した。一般に、高糖生地は15-40%のショ糖を含むため、生地中のパン酵母は高い浸透圧ストレスに曝されることが知られている²⁾。本研究では、30%のショ糖を含む標準的なパン生地をモデルとして採用した。ショ糖とトレハロースの合計が30%となるように種々の濃度でトレハロースを添加し発酵特性を調べた。図1の試験では、高糖生地に対するトレハロースの影響をFermographによる発酵力(図1A)およびメスシリンダー法による膨張力(図1B)を指標として経時的に測定した。ショ糖を完全にトレハロースに置換すると明らかに発酵力及び膨張力が低下した。しかし、ショ糖とトレハロースを1:2または2:1で添加した場合は、ショ糖のみを含む場合と比較して発酵力および膨張力ともむしろ高い値を示した。このことから、トレハロースの部分的な添加は高糖生地の発酵特性を向上させることが明らかになった。さらに、トレハロースを含む高糖生地を用いて製パン試験を行い、焼成されたパンの容積及び着色等について検討した。図2に示したよ

うに、ショ糖のみを含むコントロールと比較して、トレハロースのみを含む場合にはパン容積が著しく低い値を示した。しかし、トレハロースとショ糖を同時に含む場合にはコントロールとほぼ同等の容積を示すことが明らかとなった。また、着色については、トレハロースが非還元性の2糖であることから、メイラード反応に由来する着色物質の生成が低減される可能性が期待できるが、図2に示すように、実際にトレハロースの含有比が増えるほど、パンの色相は淡くなった。

次に、冷凍耐性に対する影響を調べた。同様の比

率でトレハロースを含む高糖生地を60分の発酵を行った後、1週間冷凍し解凍後の発酵力及び膨張力を測定してトレハロース添加の冷凍耐性に与える効果を評価した。図3Aには、解凍後の発酵力を、図3Bには解凍後の膨張力を測定した結果を示した。ショ糖のみのコントロール生地と比較して、トレハロースとショ糖を混合した場合でも発酵力、膨張力とも大きな上昇は観察されなかった。このことにより、高糖生地においてはトレハロース添加は冷凍傷害に対する保護効果を発揮しないことが明らかとなった。表1にトレハロースを含む生

表1 冷凍生地製パンにおけるトレハロース添加の高糖生地パン容積に与える効果

ショ糖量 (g/100g生地)	トレハロース量 (g/100g生地)	パン容積 (ml/100g生地)
30	0	548.29
20	10	532.52
10	20	478.19
0	30	351.20

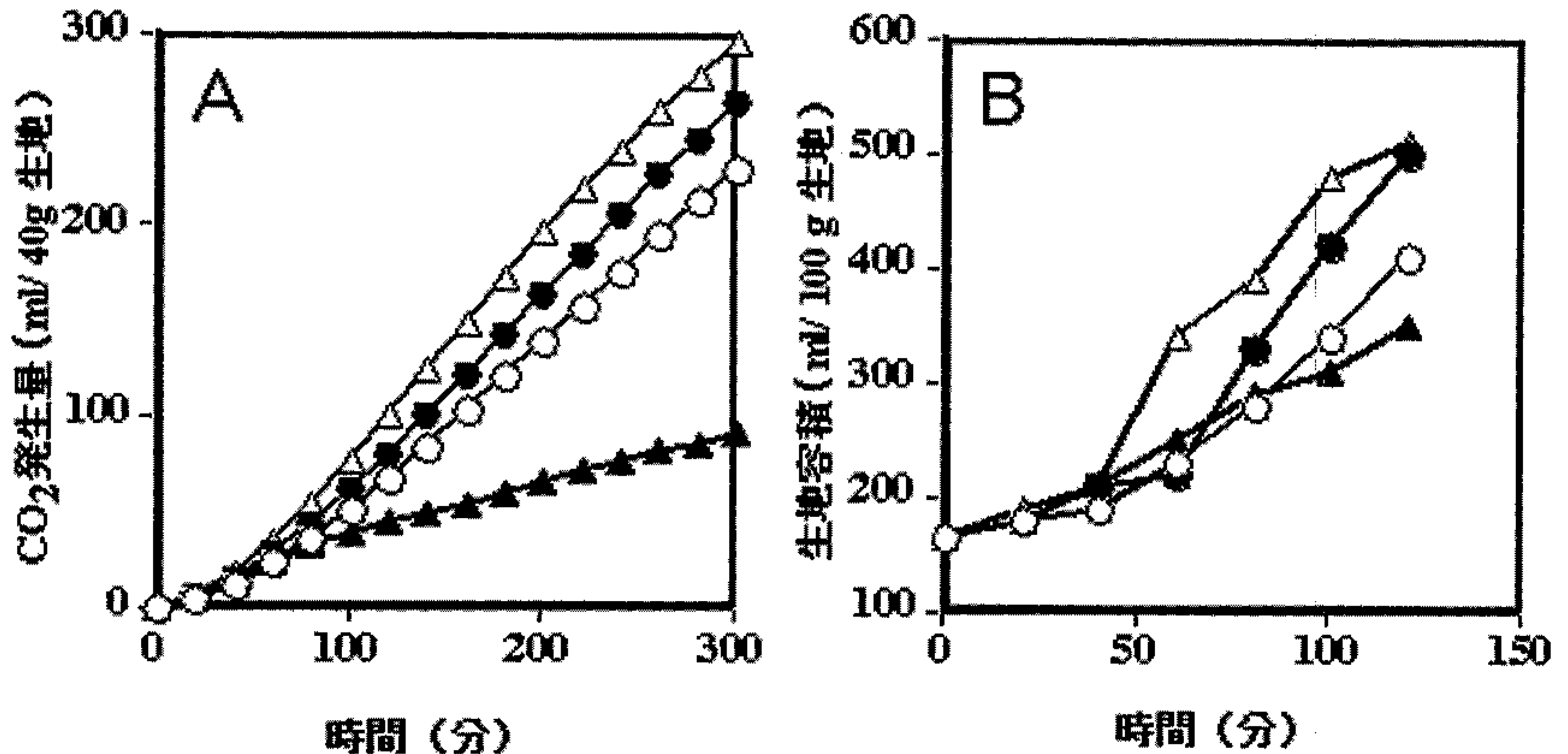


図1 高糖生地の発酵特性に対するトレハロース添加の効果

A:炭酸ガス発生量, B:高糖生地膨張力.

○; ショ糖30%, ●; ショ糖20%+トレハロース10%, △; ショ糖10%+トレハロース20%, ▲; トレハロース30%.

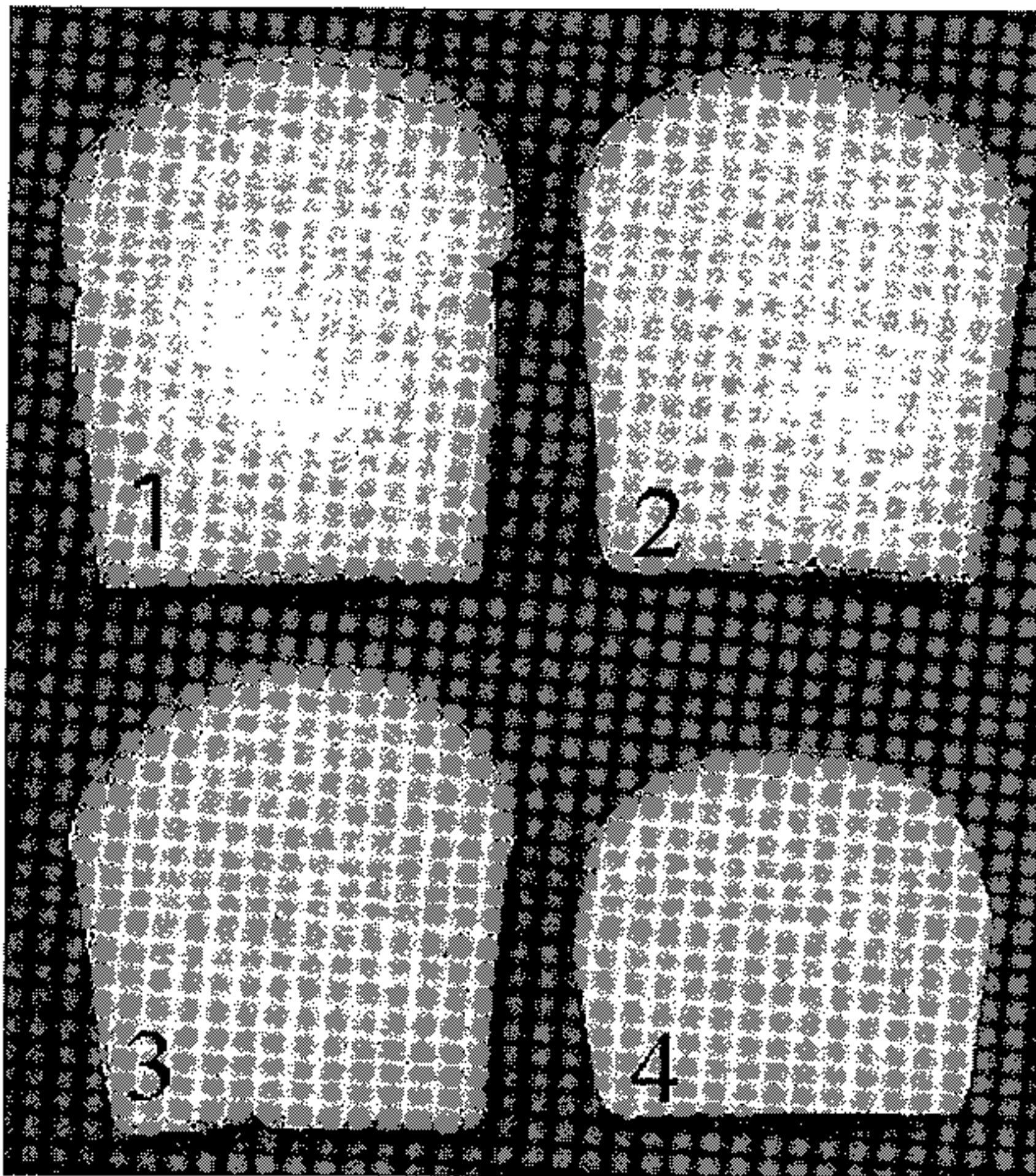


図2 トレハロースを含む高糖生地を用いた製パン試験

- 1; ショ糖30%, 2; ショ糖20%+トレハロース10%,
3; ショ糖10%+トレハロース20%,
4; トレハロース30%.

を冷凍生地製パンした場合のパン容積を示した。この結果からも、高糖生地に対するトレハロース添加は冷凍耐性の向上に機能しないことが支持される。これは、高糖生地に大量に含まれるショ糖が冷凍保護効果を既に示しているため、トレハロース添加による相乗的な効果が得られなかったためと考えられる。

2. 低糖生地発酵に与えるトレハロース添加の影響

次に、食パン等に用いられる低糖生地におけるトレ

ハロース添加の影響を観察した。一般に、低糖生地では3-5%のショ糖が生地に含まれているが、冷凍保護物質として機能する糖質の含量が低いため、冷凍傷害を受けやすいことが知られている。本研究では、5%のショ糖を含む低糖生地をコントロールとして、糖質量が合計で5または10%になるように種々の濃度で生地にトレハロースを添加して、発酵特性及び冷凍耐性を検討した。図4にトレハロースを含む低糖生地の発酵特性を発酵力及び膨張力として観察した結果を示した。その結果、ショ糖の全量をトレハロースで置換すると発酵力が低下することが明らかとなった。これは、パン酵母ではインベルターゼ活性が極めて高いのに比較して、トレハラーゼ活性が微弱であるためトレハロースが発酵糖として機能しないためと考えられる。一方、ショ糖2.5%+トレハロース2.5%の試料及びショ糖5%+トレハロース5%の試料の発酵特性はコントロール試料の発酵特性とほぼ同等であった。この結果は、高糖生地の場合と異なり、低糖生地の場合にはトレハロースの添加は発酵特性に対して有意な効果を与えないことを示している。さらに、同様の条件で、一次発酵および最終発酵を行った後焼成を行い、パンの容積および色相等を観察した。図5に示すように、トレハロースとショ糖を同時に含む試料においては、パン容積がコントロールと比較してほぼ同じであった。また、パンの色相については、高糖生地の場合と同様にトレハロースの配合比率が増加するほど、着色が少なくなることが明らかとなった。

次に、低糖生地の冷凍耐性に対する影響を観察した。一次発酵を60分行った後に、 -20°C で1週間冷凍し、図6に示すように解凍後の発酵力および膨張力を測定した。図6Aで示した発酵力では、トレハロースを含む試料の発酵力はコントロール試料の発酵力とほぼ同等であった。しかし、図6Bに示したように、膨張力についてはコントロールと比較して、解凍後のトレハロースを含む試

表2 冷凍生地製パンにおけるトレハロース添加の低糖生地パン容積に与える効果

ショ糖量 (g/100g生地)	トレハロース量 (g/100g生地)	パン容積 (ml/100g生地)
5	0	513.31
2.5	2.5	483.49
0	5	540.74
5	5	573.27

料の膨張力は明らかに高いことが示された。特に、シヨ糖5%にトレハロースを5%添加した試料では、コントロールよりも約20%膨張力が高くなっていた。しかし、この膨張力の増加と発酵力は有意な相関を示さなかった。

さらに、表2に示すように、トレハロースを含む低糖生地を冷凍生地製パンしパン容積を測定したところ、シヨ糖のみを含むコントロールと比較して、トレハロースとシヨ糖が混合して含まれる生地ではパン容積が増

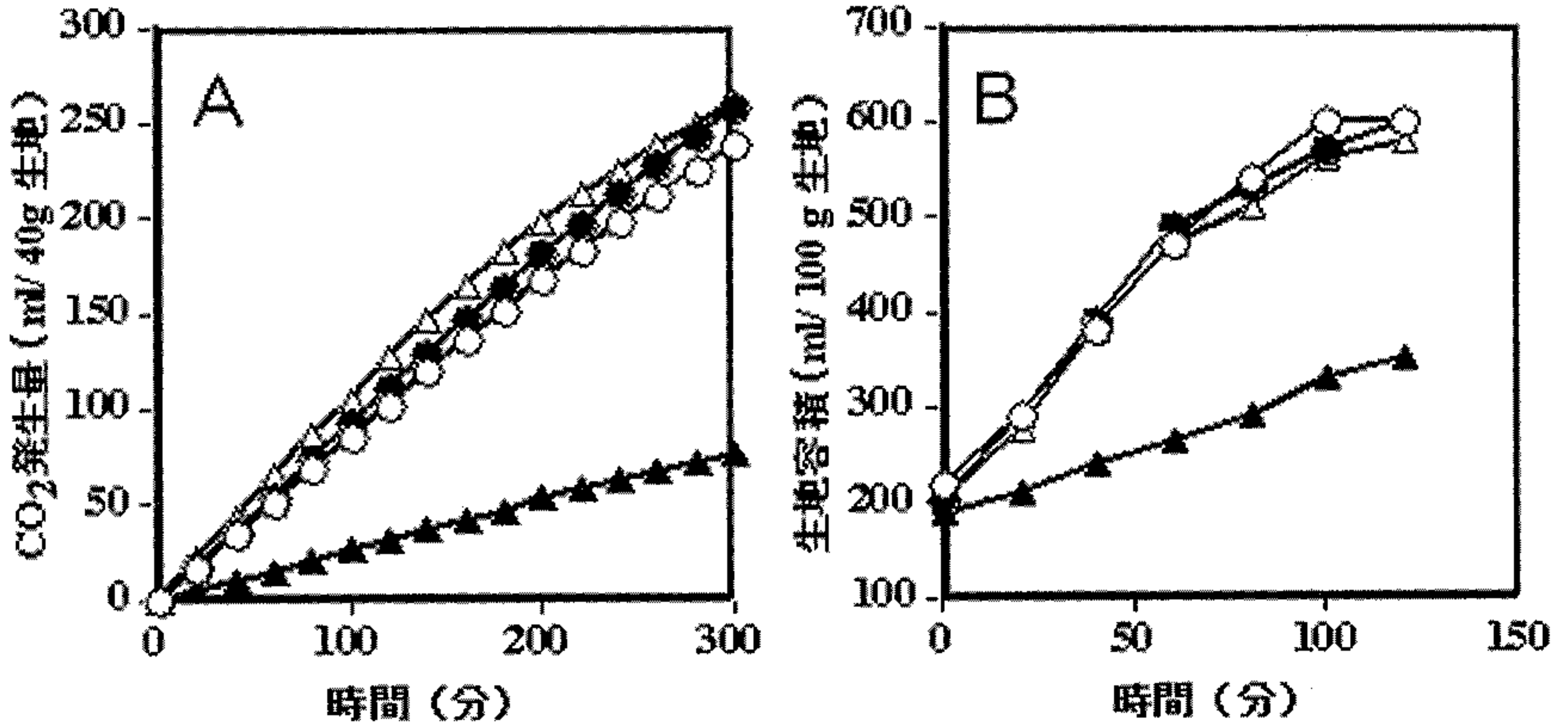


図3 高糖生地における冷凍耐性に対するトレハロース添加の効果

A; 1週間の冷凍後の炭酸ガス発生量, B; 1週間の冷凍後の膨張力.

○; シヨ糖30%, ●; シヨ糖20%+トレハロース10%, △; シヨ糖10%+トレハロース20%, ▲; トレハロース30%,

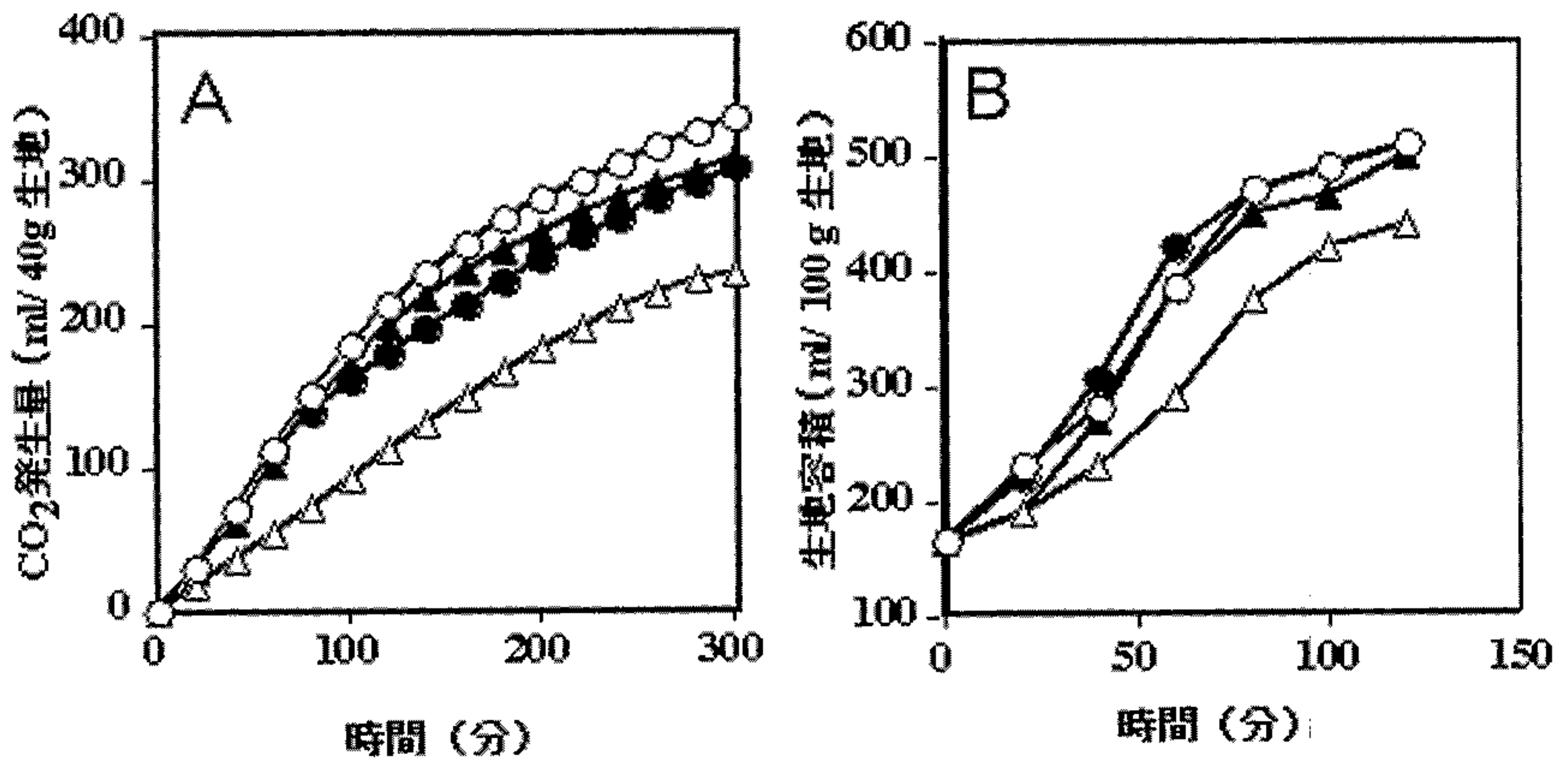


図4 低糖生地の発酵特性に対するトレハロース添加の効果

A; 炭酸ガス発生量, B; 低糖生地膨張力.

○; シヨ糖5%, ●; シヨ糖2.5%+トレハロース2.5%, △; トレハロース5%, ▲; シヨ糖5%+トレハロース5%,

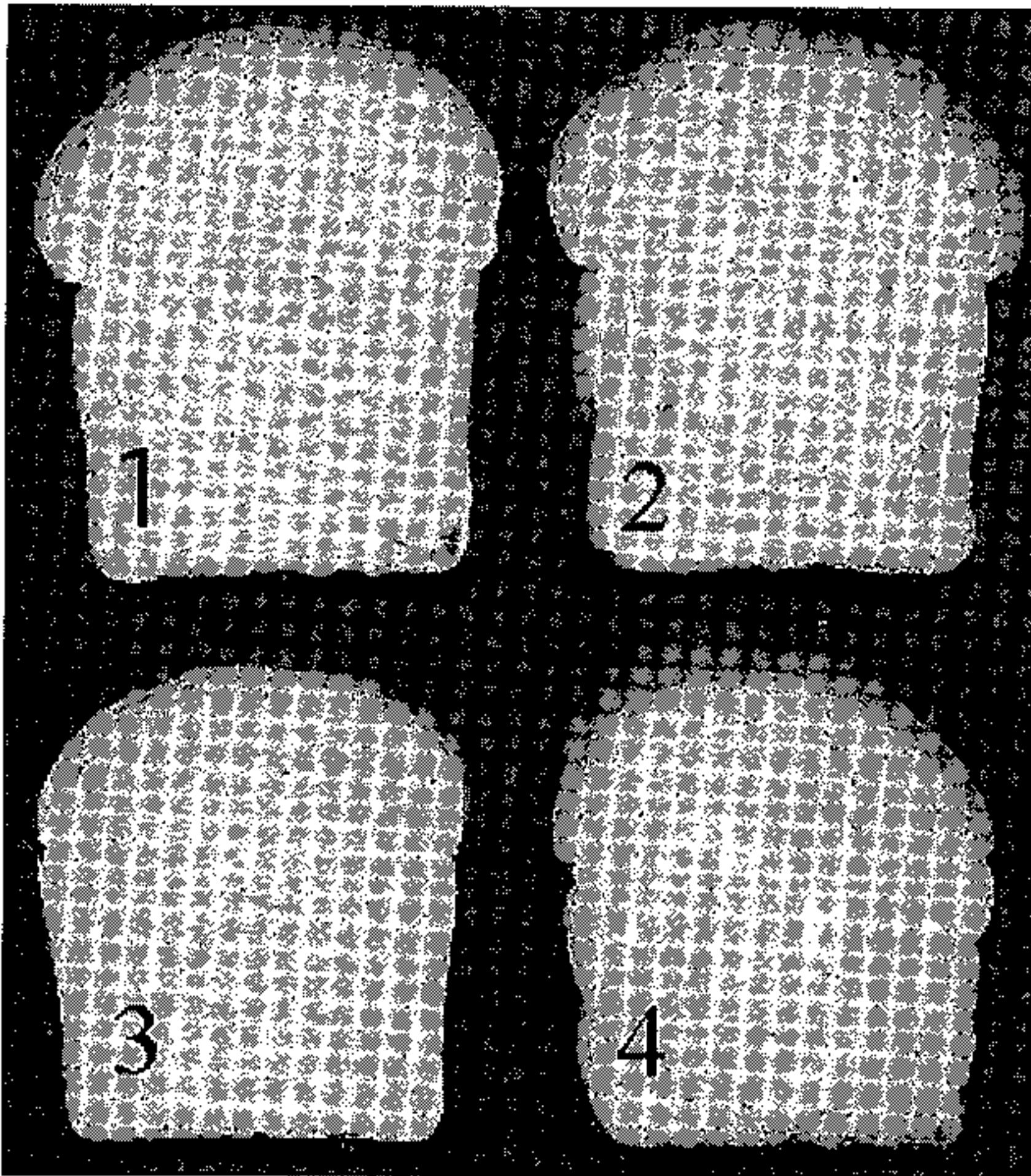


図5 トレハロースを含む低糖生地を用いた製パン試験

1; ショ糖5%, 2; ショ糖2.5%+トレハロース2.5%,
3; トレハロース5%,
4; ショ糖5%+トレハロース5%.

加していた。これらの知見は、実際の製パン過程に応用した場合には極めて有用な効果である。

本研究では、高糖生地及び低糖生地に種々の割合でトレハロースを添加し、発酵特性および冷凍耐性に与える影響を考察した。高糖生地においては、トレハロースを添加すると発酵特性は著しく改善されるが、冷凍耐性には大きな影響を与えないことが明らかとなった。現在のところ、この発酵特性の改善がどのようなメカニズムによるのかは明らかにできていない。冷凍耐性には影響を与えない原因は、高糖生地にはもともと糖質が大量に含有されており、その糖質がすでに冷凍保護物質として機能しているためであると考えられる。一方、低糖生地においては、発酵特性の変化は観察されなかったが、トレハロースを添加することにより冷凍耐性が向上することが明らかとなった。この冷凍耐性の向上の原因を推測すると、1) 生地中のトレハロースがパン酵母細胞中に取り込まれ冷凍保護物質として機能した可能性、2) トレハロース添加によりパン生地の物理・化学特性が変化した可能性、が考えられる。これらの可能性を検証するためには、パン生地中のパン酵母細胞に含まれるトレハロース含量の直接的な測定が重要である。しかしながら、小麦粉を主体として種々の糖質を大量に含むパン生地中において、パン酵母細胞中のトレハロースを特異的に検出・測定するのは極

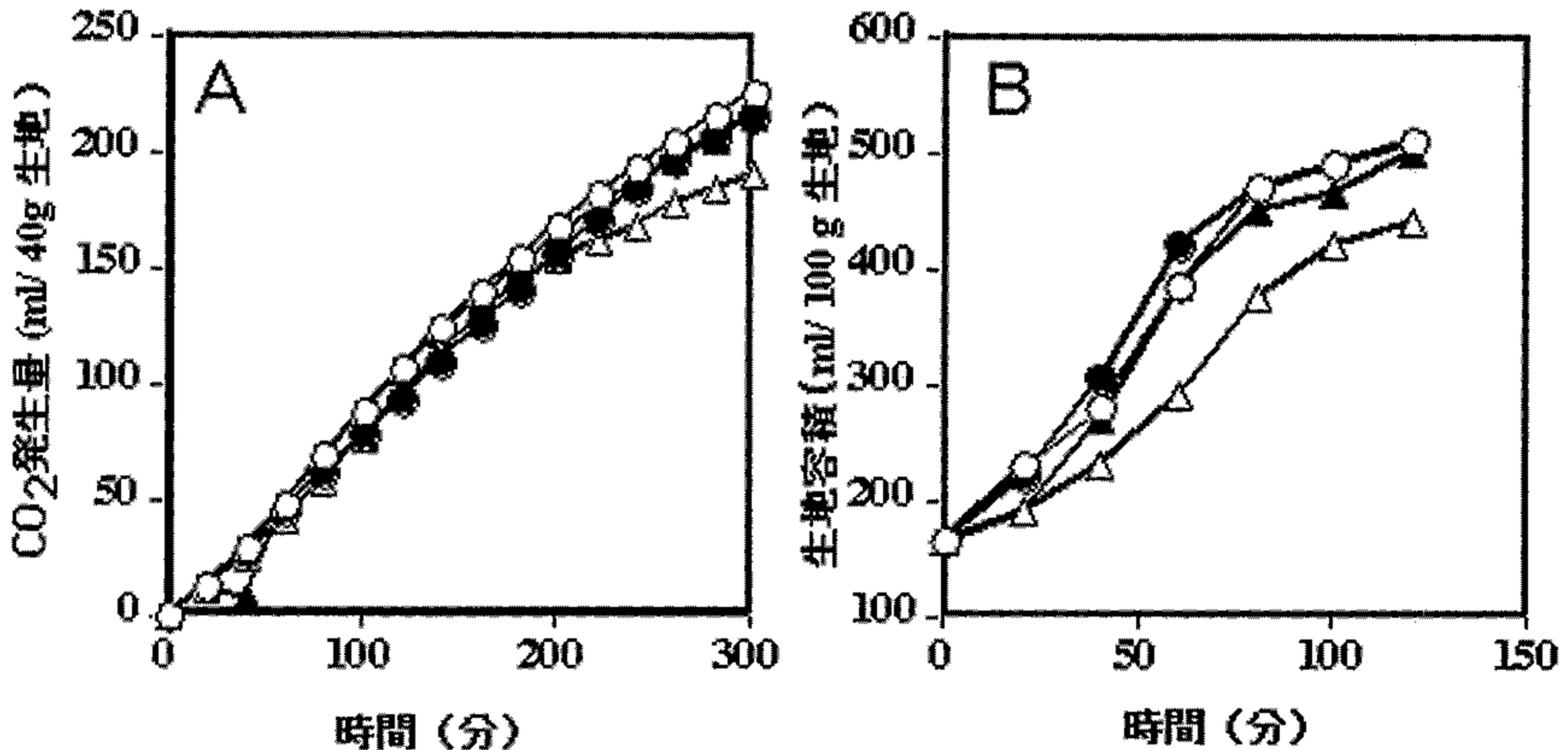


図6 低糖生地における冷凍耐性に対するトレハロース添加の効果

A; 冷凍1週間後の炭酸ガス発生量, B; 生地膨張力.

○; ショ糖5%, ●; ショ糖2.5%+トレハロース2.5%, △; トレハロース5%, ▲; ショ糖5%+トレハロース5%.

めて難しいと考えられる。Hirasawaらは溶液中のトレハロースがすみやかにパン酵母細胞に取り込まれ冷凍保護物質として機能することを報告している⁸⁾。こうした報告を合わせて考えると、パン生地中においてもパン酵母細胞にトレハロースが取り込まれた可能性が高い。

井上らは低糖生地に対するトレハロースの効果を調べるために、ショ糖またはトレハロースを別々に含む生地を凍結し、その効果を考察している⁹⁾。しかし、一般に日本で行われている製パンでは、一次発酵及び最終発酵からなる二段階の発酵工程を経る。したがって、生地に含まれる糖質を完全にトレハロースに置換すると、冷凍耐性は向上するが発酵が順調に進まない可能性が考えられる。そこで、我々は発酵及び冷凍耐性の両者を総合的に向上させるためには、ショ糖とトレハロースを一定の比率で混合し添加する方が好ましい結果が得られるのではないかと考えた。実際、ショ糖とトレハロースを混合で含む低糖生地においては、発酵特性を悪化させることなしに、冷凍耐性を向上させることが明らかとなった。本研究により、パン生地に添加する場合にはショ糖を完全にトレハロースに置換せずに、混合して用いることが肝要であるという技術的側面が強調された。

本研究では、パン生地の発酵力・膨張力の測定に基づいてトレハロース添加の効果を考察した。しかし、トレハロース添加に関してさらに詳細に考察するためには、他の手法による解析が必要であると考えている。特に、パン生地の物性の解析及び生地中のパン酵母の生理状態の分子レベルでの解析は重要であり、今後の課題である。

謝 辞

本研究は農林水産省の委託事業「先端技術の活用による農林水産研究高度化事業」による助成（課題番号1418）を受けて行った。

要 約

冷凍の過程でパン酵母を含むパン生地は冷凍傷害を受けるので、解凍後の製パン工程が阻害される。そこで、冷凍保護物質として知られるトレハロースを添加することにより、冷凍傷害が緩和される可能性を考えた。高糖生地及び低糖生地にトレハロースを種々の濃度で添加し、発酵特性及び冷凍耐性を観察した。高糖生地においては、冷凍耐性に対しては効果がなかったが、

発酵特性の改善が認められた。一方、低糖生地においては、トレハロースを添加することにより、冷凍耐性が改善されることが明らかとなった。

文 献

- 1) Hsu, K.S., Hosney, R.C. and Sib, P.A., Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasted doughs. *Cereal Chem.*, **56**, 419-424 (1979).
- 2) 田中康夫, 冷凍生地におけるパン酵母の凍結傷害, 「冷凍生地の理論と実際」, 田中康夫, 中江利昭編 (食研センター, 東京), p13-73 (1982).]
- 3) Hino, A., Kihara, K., Nakashima, K. and Takano, H., Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1386-1391 (1990).
- 4) Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. and Takano, H., Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2841-2846 (1999).
- 5) Shima, J., Sakata-Tsuda, Y., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Kawamoto, S. and Takano, H., Disruption of *CARI* Gene Encoding Arginase Enhances Freeze Tolerance of Commercial Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 715-718 (2003).
- 6) Nakada, T., Maruta, K., Mitsuzumi H., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka Y., Purification and characterization of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose trehalohydrolase, from *Arthrobacter* sp. Q36. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 2215-2218 (1995).
- 7) イースト工業会編 パン用酵母試験法 p3-25 (1996).
- 8) Hirasawa, R., Yokogawa, K., Isobe, Y. and Kawai, H., Improving the freeze tolerance of bakers' yeast by loading trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 522-526 (2001).
- 9) 井上好文, 製パンにおけるトレハロースの活用, フードケミカル **10**, 38-42 (1999).