

食品素材の機能化による新製品の開発 (機能性パン菓子の新製品開発)

苔庵 泰志* , 山崎 栄次* , 栗田 修* ,
中林 徹* , 坪内 一夫* , 井上 哲志*

Development of Cold Storage Dough with the Residue of Food Manufacture

by Yasushi KOKEAN, Eiji YAMAZAKI, Osamu KURITA,
Tohru NAKABAYASHI, Kazuo TUBOUCHI and Tetsuji INOUE

We have investigated the effects on baking properties of yeasted dough by cold storage and cold-thaw cycles with zein peptides during the storage period. Zein, water insoluble corn prolamin, was proteolysed with pronase, trypsin, chymotrypsin, thermolysin, and subtilisin. Pronase treated-zein increased CO₂ evolution by the yeast. On the other hands, the occurrence of rough bread crust was alleviated with pronase treated-zein. Hydrophobicity of zein peptides maybe have influence on the decrease of rough bread crust.

key word: zein peptides, cold storage dough

1. はじめに

近年製パン業界では新鮮でおいしいパンをどこでも食べられるように、パン生地、特に冷凍冷蔵保存生地の開発に力が入られている。^{1)~5)}例えば、冷凍パン生地製造においては、生地改良材はモノグリセリドが主に用いられている。また、パン酵母については、冷凍耐性酵母が見いだされ既に実用化されている。^{6)~9)}しかしながら、冷凍パン生地製造において、製造の過程に氷結晶の形成でグルテンが損傷を受けたり、イーストの死滅によって生地中にグルタチオンが漏洩し、グルテン中の蛋白質であるグルテリンのS-S結合が切断され、生地が軟化する等の様々な影響が生じる¹⁰⁾問題がある。

一方、トウモロコシ種子からデンプン等の有用物を抽出した残滓は、水に不溶性で栄養価に乏しいため、

飼料の他、接着剤や塗料などの工業用途に用いられ、食品素材としての有効利用は少ない。¹¹⁾¹²⁾

このような問題に対処するために、冷蔵保存後の成型パン生地での老化を抑え、ソフトで新鮮なパンを焼き上げるために、トウモロコシタンパク質由来ペプチドを用い、パン生地を改質することを研究の目的とした。

2. 実験方法

2.1 ゼインの調製

トウモロコシ種子タンパク質の主な成分であるゼインは、^{13)~15)}デンプン製造のウエットミル工程でできるコーングルテンミール等を原料とし、ヘキサン：エタノールの混合溶液(V/V=1:1)で脱脂した後、70%エタノール溶液で、攪拌しながら60℃で、6時間抽出した。

2.2 ゼインの酵素分解

* 生物食品グループ

ゼイン6gを10mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 800mlに懸濁させ、各試料につき酵素を100mgずつ加え、37 °Cで16時間の酵素反応を行なった。酵素はプロナーゼ (Pronase: 7U/mg), トリプシン (Trypsin: 40U/mg), キモトリプシン (Chymotrypsin: 90U/mg) (以上ベーリンガーマンハイム社製), サブチリシン (Subtilisin: 32.8U/mg) (ICNバイオケミカルズ社製), サーモリシン (Thermolysin: 44U/mg) (シグマ社製) を用いた。反応終了後、ペプチド液は沸騰湯浴中で5分間煮沸して(サーモリシンについては10分間、120 °Cでオートクレーブ) 酵素を失活させた。17,000 × gで10分間遠心分離し、上清にろ過助剤としてセライトを加え、ろ紙で吸引ろ過し、凍結乾燥を行い、ゼイン由来ペプチドを得た。

2.3 ゼイン分解酵素の検討

ペプチド添加後の生地の発酵力を測定し、ペプチドの種類と発酵力に相関があるかどうかを検討した。また、添加による発酵力の増加が大きかったペプチドについては、パン生地を用いた発酵試験に用いることとし、再度発酵試験と、生地の老化について検討を行った。発酵試験には、小麦生地と等価の液体培地を用いて行った。発酵力の測定はATTO (株) 製のファームグラフで行なった。

50mlの液体培地に200mgのゼインペプチドを溶解し、3gのパン酵母を懸濁させ、30 °Cで10分間予備加熱した後、同じ温度で90分間二酸化炭素発生量を測定した。ファームグラフ測定用培地組成は表1に示した。

表1 ファームグラフ測定用液体培地

組成	1ℓ 当たり配合
グルコース	5.0 g
シュクロース	50.0 g
(NH) ₂ CO	5.7 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.9 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.3mg
チアミン塩酸塩	4.6mg
ニコチン酸	46.0mg

培地50mlに対してパン酵母3gを加え、ペプチド200mgを加えた。

2.4 生地でのペプチド添加後の発酵力の検討

生地の混捏には、SKミキサー (株) 製「SK-10P」および、(株) 愛工舎製作所製「マイティ3

0」を用いた。

高糖パン生地および低糖パン生地の2種類の発酵モデルとなるパン生地を作り^{16) 17)}、プロナーゼ処理ゼインペプチドを加え、ファームグラフを用いて発酵試験を行なった。表2の配合に従って、材料をミキサーで中速5分間混捏した。パン生地を50gずつ分割成型後、5 °C、相対湿度90%で冷蔵保存し、24時間後、4日後、7日後に解冷蔵してファームグラフでパン生地発酵力を測定した。二酸化炭素発生量の測定は300分間とした。

表2 発酵試験用パン生地組成

配合(単位: g)	高糖生地		低糖生地	
	500	500	500	500
強力粉	500	500	500	500
パン酵母	15	15	15	15
砂糖	150	150	25	25
食塩	2.5	2.5	10	10
水	250	250	310	310
ペプチド	—	2	—	2

2.5 パンの試作と保存試験

実際の食パン、菓子パン生地にプロナーゼ処理ゼインを添加し、冷蔵保存後の生地の発酵、焼成したパン生地の特性について検討した。なおパン生地の発酵、焼成には三鈴工機 (株) 製「ホイロ付きオーブンDOE-02」を用い、ドウコンディショナーは同じく三鈴工機 (株) 製の試作機を用いた。

2.5.1 食パン生地の試作

最初に強力粉、イーストフード、上白砂糖、食塩、脱脂粉乳、全卵、パン酵母 (オリエンタル酵母 (株) 製「オリエンタルイースト」) に水を加えてプロナーゼ処理ゼインを添加し、縦型ミキサーを用いて低速3分間、中速4分間混捏した。次にショートニングを加え、さらに低速2分間、中速3分間、高速5分間混捏して食パン生地を得た。

得られた食パン生地を28 °C、相対湿度75%で30分発酵させた。フロアタイム20分間の後、生地を50gずつ成型分割し、ドウコンディショナーに入れて5 °C、相対湿度90%で24時間冷蔵保存した。冷蔵保存終了後、20 °C、相対湿度85%で60分間、解冷蔵した。これを38 °C、相対湿度85%で、60分間2次発酵させて、200 °Cで10分間焼成して食パンを得た。生地の配合は表3に示した。

表3 食パン生地組成

配合(単位: g)	S - 1	S - 2
強力粉	500	500
イーストフード	1	1
上白砂糖	125	125
食塩	4	4
脱脂粉乳	15	15
全卵	50	50
ショートニング	50	50
水	240	240
パン酵母	5	5
ペプチド	1	—

2.5.2 食パン生地の官能試験

表3のサンプルS-1とS-2の食パンの評価をするために、15名のパネラーによる官能検査を行なった。検査項目は、ソフト感(食べたときの食感がどう変化したか)、きめの細かさ(切ったときのすの細かさ均一性)、味(食べた人がおいしいと感じたかどうか)とした。評価は3段階評価で行った〔良い(3点)、普通、(2点)、悪い(1点)〕。結果は、15名のパネラーの評価点数の平均値として示した。なお小数点以下2桁目を四捨五入した。

2.5.3 菓子パン生地の試作

菓子パンにおいては、食パンと違い冷凍・冷蔵障害を受けると焼成後のパン表面には梨肌と呼ばれる斑点ができ、著しく商品価値が下がることが知られている。梨肌の発生は、パンの表層部分に存在している気泡膜の厚さの違いが、焼成時に色斑として現れる現象である。¹⁸⁾この解決法としては、モノグリセドをパン生地に添加することにより、生地中の疎水性タンパク質の疎水度を下げ、親水性にすることによりある程度は抑制できることが明らかとなっている。¹⁹⁾今回の検討では、生地表面での梨肌の発生に対するペプチド添加の効果と、モノグリセドとの比較、相乗効果について検討した。

菓子パン生地の製造は液種法で行ない、冷蔵用パン酵母は(協和発酵(株)製「ダイヤイーストFRZ」)を用いた。また、生地の配合割合は表4に示した。

中種生地として、まず、強力粉、上白砂糖、液卵、脱脂粉乳、液種、イーストフード、冷蔵用酵母およびペプチドに水を加え、縦型ミキサーを用いて低速3分間、中速4分間混捏して、中種生地进行を調製した。捏ね上げ後

表4 菓子パン生地配合表

配合(単位: g)	K-1	K-2	K-3	K-4
中種				
強力粉	2500	2500	2500	2500
上白	375	375	375	375
液卵	500	500	500	500
脱脂粉乳	50	50	50	50
液種*1	250	250	250	250
イーストフード	2	2	2	2
冷蔵用パン酵母	125	125	125	125
水	700	700	700	700
トレンミンモノグリセド	1	—	—	1
ペプチド	1	1	—	—
本捏				
上白砂糖	375	375	375	375
食塩	20	20	20	20
ショートニング	200	200	200	200

*1:液種の配合(g) パン酵母80、イーストフード10、上白砂糖150、薄力粉260、水500とした。

30分間ベンチタイムをとり、25℃、相対湿度75%の条件下で50分間発酵させた。

次に中種生地に、本捏配合材料として上白砂糖、食塩およびショートニングを添加混捏して本捏生地を得た。混捏条件は低速3分間、中速7分間、低速3分間、中速5分間、高速2分間を順に行なった。生地の混捏でのダメージを回復させるため、フロアタイムを15分間とり、その後生地を50gずつ成型分割した。次に生地を5℃、相対湿度90%で24時間冷蔵保存した。冷蔵保存終了後、20℃、相対湿度85%で60分間、解冷蔵した。これを37℃、相対湿度85%で、60分間発酵させ、210℃で7分間焼成して菓子パンを得た。

2.5.4 菓子パン生地の評価

各菓子パン生地サンプルの評価を、表面の梨肌の出現割合で評価した。Aは梨肌の発生がほとんどみられない場合を、Bはナシ肌の発生数が約50%になった場合を、Cは梨肌が発生している場合を目視によりそれぞれ評価した。

2.6 ペプチドの分析

調製したペプチドは複数の異なった分子量を持つオリゴペプチドの混合物であるので、どのようなペプチドであるかを推察するために、アマシャムファルマシアバイオテク(株)製タンパク質精製装置「FPLCシステム」、並びに島津製作所(株)製ペプチド分離精製装置「LC-10」、ヒューレットパッカード社製のタンパク質シーケンサー「G1005A-001」による解析を行った。

2.6.1 限外濾過並びにゲル濾過

酵素処理したペプチド液を、ペリスタポンプを使って限外濾過膜(ミリポア社製PM-10)に通し、分

子量10000以下の画分を集めた。

得られた濾液300mlを、分離溶媒を超純水として2.0 ml/minの条件でゲル濾過カラム (Sephadex-LH20:3.2x 90cm) で分画し、分画液を10mlずつ試験管に集めた。この操作により、脱塩および主なピークの濃縮を行った。

2.6.2 HPLC (LC-10) による分画

2.6.1で得られたペプチド液の溶媒を乾燥させて濃縮後、再び超純水に溶解して試料とした。HPLCでは、アセトニトリル：超純水の濃度勾配による逆相カラムクロマトを行い、さらなる精製と、分析を行った。凍結乾燥したペプチド40mgを水1mlに溶解し、PTFE膜 (0.2 μ m) でろ過し、100 μ lを流速1.0ml/min, ODSの逆相カラム (信和化工 (株) 製「STR ODS-II」, 4.6x150mm, 粒径5 μ m, 細孔径120 μ m) に添加した。分離の条件は次のとおりである。(流速：1.0ml/min, グラジエント：超純水 アセトニトリル：10~50min, アセトニトリル10~100%) 分離したした主なフラクションを、さらに次の条件で精製した。(流速：1.0ml/min, グラジエント：超純水 アセトニトリル：10~40min, アセトニトリル10~60%)

2.6.3 ペプチドの分析

2.6.2で得られたシングルピークのフラクションについて、プロテインシーケンサーで分析した。

3. 結果と考察

3.1 ゼイン分解酵素の検討

プロナーゼ、サブチリシンは比較的タンパク質を小さな断片にする特性を持ち、トリプシン、キモトリプシンは特定の部位を切断する傾向が強く、サーモライシンはその中間的な性質を持つ。図1に、ペプチド添加による培地中からの二酸化炭素の発生量を示した。発酵により発生する二酸化炭素の量は、ゼインをプロナーゼ処理して得られたペプチドを添加した培地が最も多かった。キモトリプシン、サブチリシン処理ペプチド添加では無添加より二酸化炭素発生量が減少したが、これは、酵母に対する培地中の浸透圧等の変化が、何らかの影響を与えたものと考えられる。

ペプチド違いによる発酵力の変化は必ずしも特定できなかったが、以後生地での検討には発酵力増加の最も多かったプロナーゼ処理ゼインを用いることとした。この結果については、推測の域を出ないが、プロナーゼはいくつかのエンド、エキソペプチダーゼの混合物で基質特異性が低く、タンパク質をランダムに切断し

て小さなペプチドやアミノ酸にする傾向が強いため、培地中で酵母の利用できる栄養素が増え、酵母の活性が高まった等が考えられる。

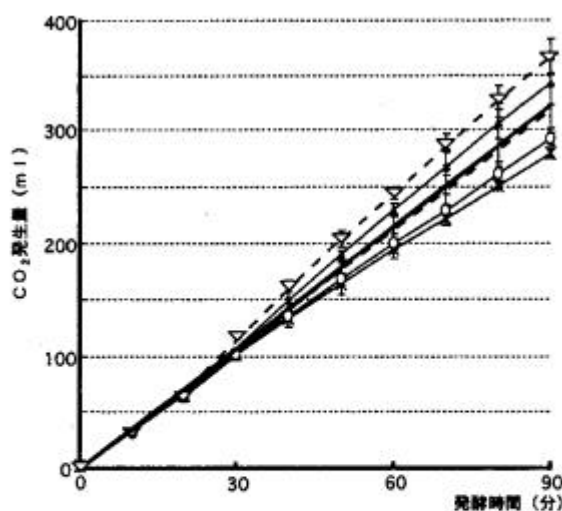


図1 添加ペプチドの違いによるCO₂の発生状況

—○— ペプチド無添加
---□--- サーモライシン処理
—△— トリプシン処理
---◇--- プロナーゼ処理
—▽— キモトリプシン処理
---○--- サブチリシン処理
発酵温度30℃
5℃冷蔵保存24時間
200mgペプチド/50ml培地

3.2 生地でのペプチド添加後の発酵力の検討

高糖生地において、図2の発酵時間前半より後半に向けて、二酸化炭素の発生は尻上がりに進むが、4日目以降のペプチド添加の効果は良好であった

低糖生地では、4日目冷蔵保存までは、図3の発酵時間前半は、若干ペプチド添加の効果が表れ、発酵時間が後半に行くに従ってその差はほとんどなくなった。7日目保存では総二酸化炭素発生量はペプチド添加無添加ともに減少し、冷蔵保存による生地の老化が認められたが、二酸化炭素発生量の減少はペプチド添加により抑えることができた。

発酵力に関しては、低糖生地よりも高糖生地においてのほうが、ペプチド添加の効果は期待できる。

3.3 プロナーゼ処理ゼイン添加パンの試作と保存試験

3.3.1 食パン生地の官能試験

表5に結果を示した。プロナーゼ処理ゼインを添加して調製したパンのほうが、無添加のパンよりも、全ての項目において数値が大きくなり、官能特性の改善が示唆された。大豆タンパクや、脱脂粉乳をパン生地に混ぜると生地の風合いや食感を改善することが知られている。本研究のペプチド添加においても、少なく

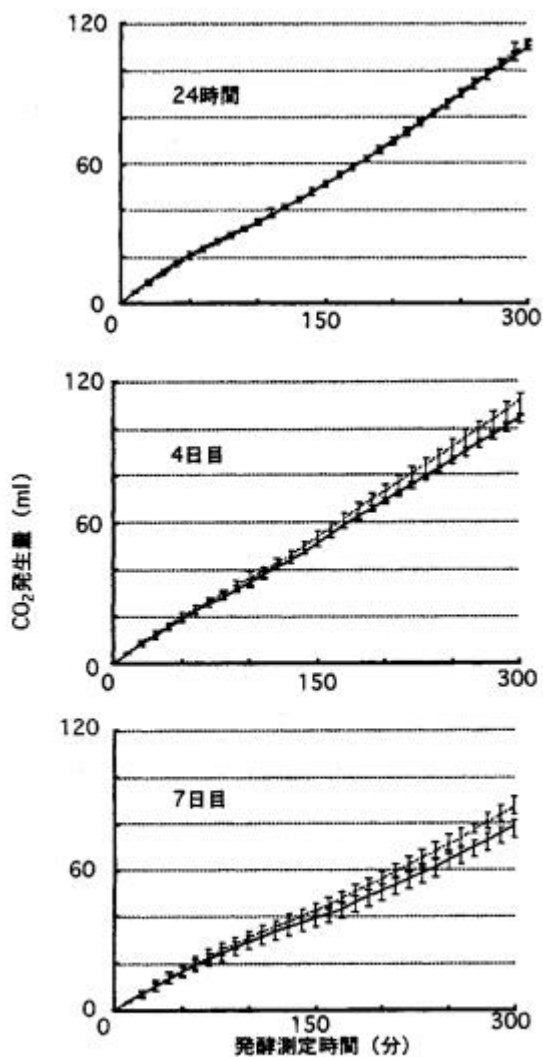


図2 冷蔵による発酵力の変化(高糖生地)
 発酵温度30℃ + ペプチド無添加
 5℃で冷蔵保存 - - ペプチド添加

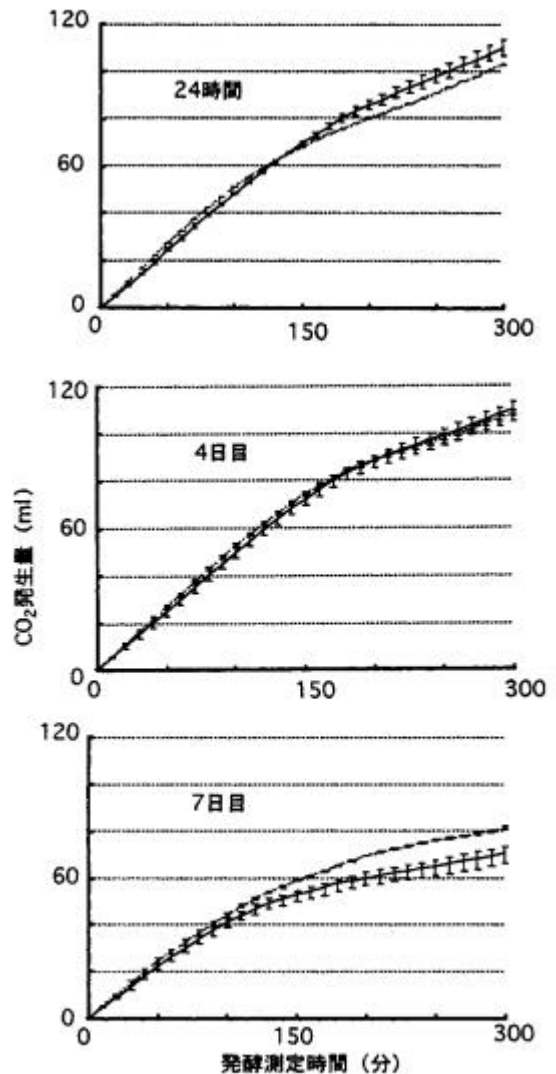


図3 冷蔵による発酵力の変化(低糖生地)
 発酵温度30℃ + ペプチド無添加
 5℃で冷蔵保存 - - ペプチド添加

表5 食パン官能試験結果

	S-1	S-2
ソフト感	2.7	2.0
きめの細かさ	2.5	1.9
味	2.5	2.2

とも官能試験上はペプチド添加によって、冷蔵保存生地の品質が改善する効果が期待できると思われた。

3.3.2 菓子パン生地の表面評価

結果は表6に示した。表4の配合で調製したパン生地は、K-1はオレイン酸モノグリセリドとペプチド

との相乗効果を、K-2はペプチド単独での効果を、K-3はペプチド、モノグリセリド無添加のときを、K-4はモノグリセリド単独での効果についての検討である。K-1およびK-2はK-3およびK-4に比べて結果が優れており、特にK-1は目視での梨肌の発生がほとんど緩和され、最も優れていた。

結果は図には示していないが、ペプチド添加後の生地中の小麦グリアジンを分画すると、水への溶解性は添加前と比べてほとんど変化がなかった。そこで、本研究での梨肌の発生の抑制は、低分子化したペプチドもしくはアミノ酸が、生地中に混在することによって、全体として生地の表面の疎水度が緩和されたと考えられた。

表6 菓子パン表面の梨肌発生状況

K-1	K-2	K-3	K-4
A	B	C	B

3.4 ペプチドの分析

3.4.1 限外濾過並びにゲル濾過

結果は図4に示した。780ml付近のメインのピークについてフラクションコレクターで画分を集め、HPLC分取用のサンプルとした。

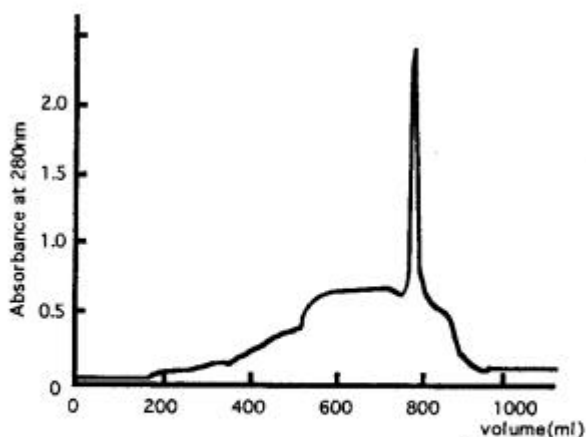


図4 プロナーゼ処理ゼインのゲルろ過

Column: Sephadex LH20 (3.2x90cm)
Flow rate: 2.0ml/min
Eluent: Milli-Q water

3.4.2 逆相カラムクロマトによるペプチドの分離

アセトニトリル10~100%での第1回目のクロマトグラムを図5に示した。このグラフからゼインペプチドの特性として、水には溶けるが依然として表面の疎水性の性質が大きいことが分かった。得られた、メインのピークについて、再分離を行い、減圧下で濃縮して2回目の分離を行って、夾雑ピークを除いた後、さらに再クロマトを行い、濃縮した後、プロテインシーケンサー用のサンプルとした。

酵素分解では、プロナーゼの性質上、元のタンパク質は分子量の小さい画分に断片化されており、主としてどのような性質のペプチド分布になっているかを推定した。

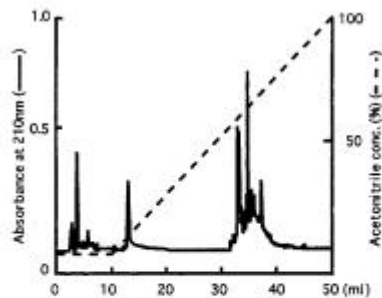


図5 HPLCによるプロナーゼ処理ゼインの分離

Column: STR ODS-II (4.6x150mm, beads ϕ 5 μ m, pore ϕ 120 \AA)
Flow rate: 1.0ml/min
Eluent: Acetonitrile-Milli-Q water

3.4.3 ペプチドの分析

分析の結果、本ペプチドは分子量が数千以下の短いオリゴペプチドの混合物であることが分かった。さらに、LC-10で検出できた主なピークの配列は、ほとんどが、トリペプチド(3量体)からテトラペプチド(4量体)以下の小さな重合体であることがわかった。このことはプロナーゼの基質特異性からも一致する。

4. まとめ

本研究では、従来食品への有効利用が図られていなかったトウモロコシタンパク質ゼインを、蛋白質分解酵素プロナーゼを用いて分解して水溶性のペプチドとすることにより、冷蔵したパン生地の発酵力を高糖生地においては一部改善することができた。また、このペプチドを配合することにより、冷蔵保存後のパン生地の食感劣化は、官能検査の結果において、良好な結果が得られた。また、直接目視による菓子パン生地の表面の観察でも、梨肌の発生を緩和できることを見いだした。ペプチドの逆相カラムクロマトでは、水溶性のゼインペプチドの表面は依然として疎水性部分が多く残っていることが分かった。モノグリセリドの梨肌改善への作用機構を考えると、このペプチドの疎水性も何らかの作用を担っていることが示唆された。

参考文献

- 1) Hino, A., Tanaka, Y., Takano, H.: Cereal Chem., Vol. 64(4), 269-275, (1987)
- 2) Inoue, Y., Bushuk, W.: Cereal Chem., Vol. 68(6), 627-631 (1991)
- 3) Autio, K., Sinda, E.: Cereal Chem., Vol. 69(4), 409-413, (1992)
- 4) 井上好文: パン科学会誌. Vol. 39(9), 3-15, (1993)

- 5) Inoue, Y., Sapirstein, H.D., Takayanagi, S., Bushuk, W.: *Cereal Chem.*, Vol. 71(2), 118-121, (1994)
- 6) Gelinas, G., Fiset, G., LeDuy, A., Goulet, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(10), 2453-2459, (1989)
- 7) 高野博幸：日本醸造協会誌 . Vol. 84(2), 88-94, (1989)
- 8) Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K., Takano, H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 56(5), 1386-1391, (1990)
- 9) McKown, R.L., Warren, G.J.: *Cryobiology*, Vol. 28, 474-482, (1991)
- 10) 河合弘康：化学と生物 . Vol. 31, (6), 374-381, (1993)
- 11) 高橋秀和：食品と開発 . Vol. 30, (12), P45-47 (1994)
- 12) 山田浩司, 野口明德, 高橋秀和：日本食品科学工学会誌 . Vol. 43(3), 306-312, (1996)
- 13) Wilson, C.M.: *Seed Proteins*, Gottschalk, W., Muer, H.P., eds, (Nijhoff, M./Junk, W. Publishers, The Hague), p.271-307, (1983),
- 14) Wilson, C.M.: *Corn*, Watson, S.A., Ramstad, P.E., eds, (American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul), p.273-310, (1987)
- 15) Essen, A.: *J.Cereal Sci.* Vol. 5, 117 (1987)
- 16) 田中康夫, 松本博：製パンの科学 (I) 製パンプロセスの科学, 光琳出版, (1991)
- 17) 田中康夫, 松本博：製パンの科学 (II) 製パン材料の科学, 光琳出版, (1992)
- 18) 安藤正康, 一言撰, 荒船由佳：日本食品科学工学会誌 . Vol. 43(7), 812-820, (1996)
- 19) 井上茂孝：日本食品科学工学会第44回大会講演集 . p182-183, (1997)