

## 饅頭生地の膨化におよぼす *Enterobacter cloacae* GAO の影響

田村 朝子, 長野 宏子\*, 大森 正司\*\*,  
庄 司 善哉\*\*\*, 荒井 基夫\*\*\*\*

(山形県立米沢女子短期大学, \* 岐阜大学教育学部, \*\* 大妻女子大学家政学部,  
\*\*\* 秋田大学教育文化学部, \*\*\*\* 大阪府立大学農学生命科学研究科)

原稿受付平成 14 年 1 月 11 日; 原稿受理平成 14 年 11 月 21 日

### Effect of *Enterobacter cloacae* GAO on the Swelling of Dough

Asako TAMURA, Hiroko NAGANO, \* Masashi OMORI, \*\*  
Zenya SHOJI\*\*\* and Motoo ARAI\*\*\*\*

Yonezawa Women's College of Yamagata Prefecture, Yonezawa 992-0025

\* Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-1112

\*\* Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075

\*\*\* Faculty of Education and Human Studies, Akita University, Akita 010-0852

\*\*\*\* Graduate School of Agriculture and Biological Science,  
Osaka Prefecture University, Sakai 599-8531

*Mantou* (sweet bun) made by using dough fermented with *Enterobacter cloacae* GAO had a dough surface that was smoother than the dough surface fermented with yeast. Aerated cells of the *mantou* were also finer. Swelling of the dough which was fermented with *E. cloacae* GAO resulted in slight expansion in the horizontal direction, while on the dough which was fermented with yeast expanded in three dimensions. This may have been due to the differing softness of the dough samples. We therefore studied the hydrolysis of the flour protein components, gluten, glutenin and gliadin. The hydrolysis patterns of gliadin were found to be different between *E. cloacae* GAO and yeast.

(Received January 11, 2002; Accepted in revised form November 21, 2002)

**Keywords:** *Enterobacter* エンテロバクター, dough ドウ, gluten グルテン, glutenin グルテニン, gliadin グリアジン.

#### 1. 緒 言

小麦粉発酵食品, 特にパン製造においては, その発酵時間の短さ, 簡便さから酵母が膨化剤として工業的に広く用いられている. 中国では, 小麦粉発酵食品である饅頭や包子を製造する際, 酵母を膨化剤として用いない, 自然発酵法の老麺 (ラオメン) 法が伝統的に用いられてきた. この老麺法とは, 果物や野菜のスライスを浸漬させた水をスターターとして用いる方法である. リンゴスライス浸漬水をスターターとして, 老麺法で饅頭を製造した結果, 風味豊かな美味しい饅頭ができあがった<sup>1)</sup>. また, この饅頭の発酵生地からは

酵母は検出されず, *Enterobacter cloacae* GAO が分離された<sup>2)</sup>. さらにこの細菌を用いて饅頭を製造した場合, 酵母で製造した饅頭に比較して, 生地表面がなめらかで, 生地内部のすだちも均一で細やかなものができあがった<sup>3)4)</sup>. また, 発酵の際, 酵母を用いたものは, 短時間で, 二酸化炭素を産生しながら球状に丸く生地が膨化したのに対して, *E. cloacae* GAO を用いたものは, 生地が酵母と同程度まで膨化するのに酵母の 2~3 倍の発酵時間を要した. また発酵時には水素ガスを産生<sup>5)</sup>しながら, 酵母に比較して生地は水平方向にも膨化することが特徴的に認められた. このことか

ら、酵母と *E. cloacae* GAO では、異なった代謝系で小麦タンパクの異なった部位に酵素が作用して生地を膨化させているのではないかと考えられた。そこで生地膨化に作用する酵素の作用部位の違いを明らかにすることを目的に研究を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 培養方法

*E. cloacae* GAO の培養は、前報告<sup>5)</sup>にしたがって行った。すなわち、*E. cloacae* GAO を液体 G 培地 (glucose 20 g, L-asparagine 2.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.28 g, D.W. 1,000 ml, pH 6.8) を用いて 37℃ で培養を行った。

### (2) 饅頭の調製および生地膨化試験

饅頭は前報告<sup>5)</sup>にしたがって、*E. cloacae* GAO および酵母を用いてそれぞれ調製した。生地膨化試験は、500 ml 容メスシリンダーに *E. cloacae* GAO および酵母の生地 25 g をそれぞれ入れ、37℃ で酵母は 2 時間、*E. cloacae* GAO は 6 時間発酵を行い、生地の膨化を調べた。

### (3) 培養液中アルコール成分の分析

*E. cloacae* GAO の培養液 1,000 ml に内部標準物質エチルデカノエート 100 ppm を添加し、Likens-Nickerson 改良型の連続蒸留装置で堀田と原の方法<sup>6)</sup>にしたがい、連続蒸留抽出法 (SDE 法) で蒸留を 60 分行った。得られた香気濃縮物をガスクロマトグラフ GC-14 A (島津製作所) で分析し、成分の同定は GC-MS QP-1000 (島津製作所) および M-2500 (日立) で行った。ガスクロマトグラフの分析には PEG-20 M キャピラリーカラム (50 cm ×  $\phi$  0.25 mm) を用い、カラム温度は 1 分間に 2℃ の昇温で 50~180℃ まで昇温分析を行った。キャリアーガスにはヘリウム (5 ml/分) を用い、検出器には FID を用いた。

### (4) 小麦タンパク質可溶化試験

生地の発酵過程で *E. cloacae* GAO が産生する酵素の小麦タンパク質への影響を検討するため、小麦タンパク質 (グルテン, グルテニン, グリアジン) (東京化成工業 (株)) をそれぞれ基質として 5% を培養液に添加して作用させ、37℃ で 24 時間培養後、タンパク質の変化を確認した。

*E. cloacae* GAO 培養液に小麦タンパク質をそれぞれ 5% 添加し、37℃ で 24 時間振盪を行った。これを遠心分離 (5,000 × g, 10 分) し、得られた上清を用いて可溶化したタンパク量を Lowry 法<sup>7)</sup>で測定し、タンパ

ク質の挙動は、SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動<sup>8)</sup>で検討した。なお、基質とした小麦タンパク質の添加濃度を 5% とした理由は、饅頭製造に用いる小麦粉のタンパク質含量が 10% 程度 (強力粉: 薄力粉 = 1:1 で混合。タンパク質含量 強力粉 12%, 薄力粉 7.5%) であり、そのうちの約 50% がグルテンであるとされている<sup>9)</sup>こと、グルテンはグルテニンとグリアジンから形成される<sup>10)</sup>ことなどから、小麦粉を使用した場合と同程度の組成とするため 5% とした。また、*E. cloacae* GAO との比較検討のため、酵母についても G 培地に対して 2% のドライイースト (日本製粉) を加えたものを酵母懸濁液として、*E. cloacae* GAO と同様に基質の小麦タンパク質 5% を添加して振盪を行った。

## 3. 結果および考察

### (1) 饅頭および生地膨化の比較

*E. cloacae* GAO および酵母で調製した饅頭の断面を Fig. 1 に、生地膨化試験の結果を Fig. 2 にそれぞれ示した。Fig. 1 上は中心から 2 等分した際の断面で、下はその断面の一部を拡大したものである。

その結果、Fig. 1 より、生地の膨化の仕方が *E. cloacae* GAO と酵母で異なることが上の断面からわかる。すなわち、酵母で調製した饅頭は球状に丸く、大きく膨化しているのに比べ、*E. cloacae* GAO で調製した饅頭は、水平方向にも膨化していた。スライス断面の構造は、*E. cloacae* GAO は気泡が小さく均一で密であるのに比べ、酵母で調製したものは大きな気泡が存在し、気泡のバラツキが大大であった。生地膨化写真 (Fig. 2) は、生地体積が最大になった状態を示したものである。この結果からも、生地のすだちが蒸した後の饅頭の気泡状況に大きく影響しているものと思われる。*E. cloacae* GAO が酵母と同じ高さまで膨化するのに、酵母の 3 倍の時間を要したが、これは、二酸化炭素の発生量および発生速度をはじめ、グルテンタンパク質への微生物の作用の差が考えられる。これらの要因が、すだちの大きさにも起因するものであるとも考えられた。

### (2) 培養中のアルコール成分の変化

酵母は生地発酵に際して、エチルアルコールと二酸化炭素を生成し、小麦タンパク質のアルコール可溶性グリアジンの一部を溶かし、生地の弾力を作り出す<sup>9)</sup>ことが知られている。

*E. cloacae* GAO 培養液のアルコール成分の分析を行

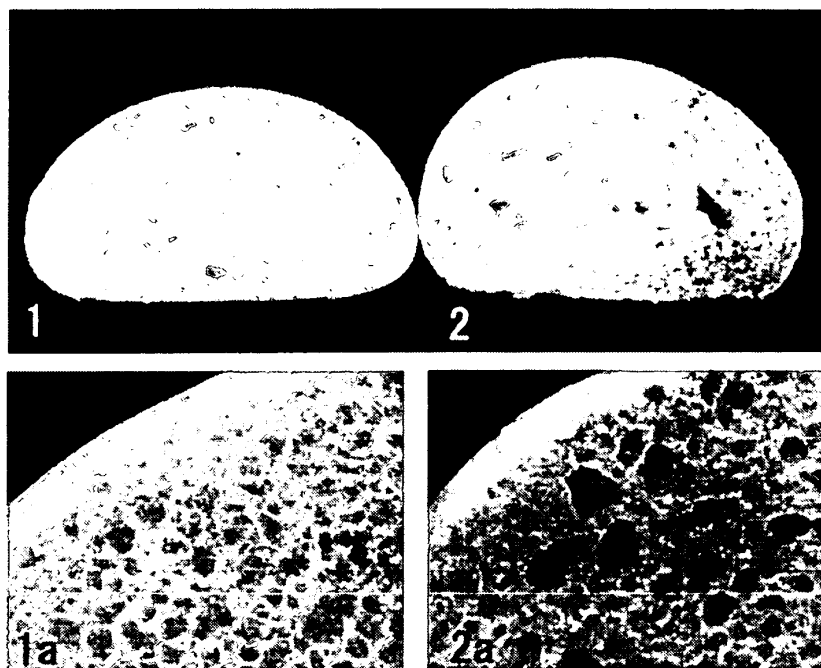
饅頭生地の膨化によぼす *Enterobacter cloacae* GAO の影響

Fig. 1. Comparison of the cross section of *mantou* prepared with *E. cloacae* GAO and yeast

1, 1a: *E. cloacae* GAO; 2, 2a: yeast. 1, 2: Cross section of *mantou*. 1a, 2a: magnification of the cross section.

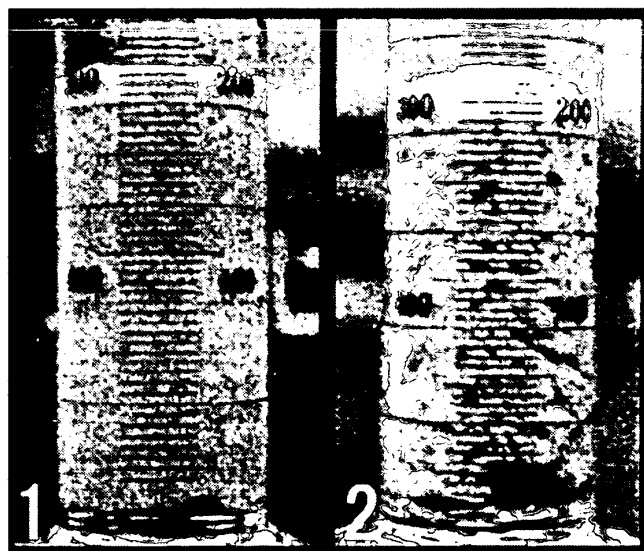


Fig. 2. Comparison of dough prepared with *E. cloacae* GAO and yeast

1: *E. cloacae* GAO; 2: yeast.

った結果、検出されたアルコール成分のほとんどはエチルアルコールであり、その他はイソアミルアルコールと2-フェニルエチルアルコールが微量検出された。またエチルアルコールは培養液に対して10,000 ppm

産生されており、25 g の饅頭1個当たり約830 ppm が産生されていたことになる。このことから、*E. cloacae* GAO も酵母と同様に発酵過程でエチルアルコールを産生することが明らかになった。したがって生地の弾力形成や風味にもエチルアルコールが関与しているものと推測される。しかし *E. cloacae* GAO は、酵母と異なり発酵の際、水素ガスを産生<sup>5)</sup>し、さらにコハク酸と乳酸を産生<sup>11)</sup>することが明らかになっており、生地の発酵メカニズムが *E. cloacae* GAO と酵母とは異なるものと考えられた。

### (3) 小麦タンパクに対する *E. cloacae* GAO の影響

小麦タンパク質に対する *E. cloacae* GAO 培養液の影響結果を Fig. 3 に示した。その結果、24 時間培養を行ったが、培養液に対して、グルテンとグリアジンは6時間で可溶化し、グルテンにおいてはグリアジンよりはきめは粗いものの、白く泡立って発酵生地のすだちのような状態になった。グリアジンはきめの細かい白い泡ができ、大きく泡立った。それに対してグルテニンは、培養液中でほとんど可溶化せず、グルテニンは沈殿するか、懸濁した状態で、液体の色はグルテニンの黄色のままであった。このことから、*E. cloacae* GAO はグルテニンに対してほとんど作用せず、

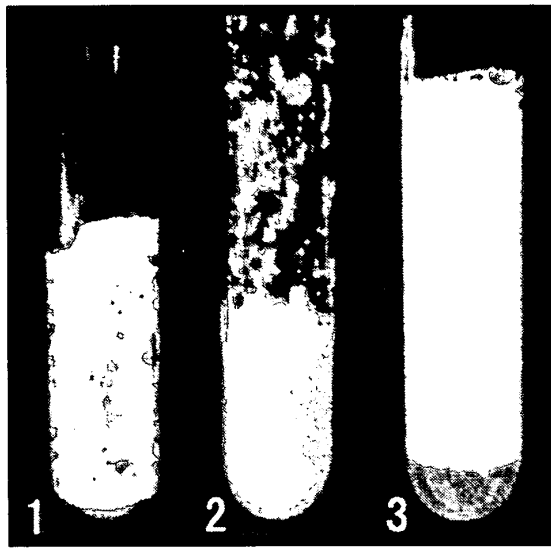


Fig. 3. Comparison of wheat protein solubilization in the culture solution of *E. cloacae* GAO

1: gluten; 2: glutenin; 3: gliadin.

グリアジンに対して強く作用するといえる。Table 1にLowry法による可溶化タンパク質の増加量の定量結果を示した。その結果、Fig. 3と同様に *E. cloacae* GAOはグリアジンに最も強く作用していることが明らかになった。酵母の結果と比較すると、グルテンを基質とした場合に違いが認められた。Fig. 2で *E. cloacae* GAOは生地膨化に酵母の3倍の時間を必要とすることが確認された。Table 1において、*E. cloacae* GAOのグルテンの可溶化量が酵母の1/3程度であることから、これを裏付ける結果であったといえる。しかし、グリアジンを基質とした場合の可溶化量が *E. cloacae* GAOと酵母が同程度であったことから、生地膨化に際して *E. cloacae* GAOのタンパク分解酵素は、酵母の酵素よりも強い割合で小麦タンパク質のグリアジンに作用すると考えられた。

#### (4) 微生物酵素による小麦タンパク質分解の比較

グルテンを基質とした場合の電気泳動結果をFig. 4に、グルテニンを基質とした場合の結果をFig. 5に、グリアジンの結果をFig. 6にそれぞれ示した。

その結果、グルテンを基質とした場合、*E. cloacae* GAOにおいては、0時間では認められなかった25 kDaと18 kDa付近にバンドが認められ、これはG培地では確認されなかったことから *E. cloacae* GAOの酵素がグルテンに作用して分解したものであるといえる。酵母においても、25 kDaのバンドが確認された。

グルテニンを基質とした場合は、*E. cloacae* GAO、

Table 1. Change in solubilized protein

Substrate	<i>E. cloacae</i> GAO		Yeast	
	0 h	24 h	0 h	24 h
Gluten	0	555	0	1,649
Glutenin	0	468	0	799
Gliadin	0	2,943	0	2,973

unit: mg of solubilized protein/100 ml of reaction mixture. Data show the increased amount of protein in the culture broth. Protein amounts at 0 h: gluten, 365 mg; glutenin, 1,030 mg; gliadin, 430 mg.

酵母ともにTable 1でタンパク質を分解しているにもかかわらず大きな変化は認められなかった。これは、グルテニンの分子量が500 kDa (50万)と非常に大きいため、分解されたタンパク質の分子量も電気泳動で検出されない大きな分子量であったのではないかと推察される。この結果と、Fig. 3, Table 1の結果から、グルテニンは生地発酵にはあまり影響を及ぼさない小麦タンパクであると考えられた。

グリアジンを基質とした場合、まず、いずれのサンプルからも15 kDa付近にバンドが確認され、またグルテンを基質とした場合にもこのバンドが共通して検出されたことから、これはグリアジン由来のものであると考えられた。また、グルテンで *E. cloacae* GAOのみで確認された18 kDaのバンドも同様に *E. cloacae* GAOで確認され、酵母では確認されなかった。以上のように、*E. cloacae* GAOと酵母で電気泳動パターンに違いが認められ、電気泳動以外の結果と総合して考えると、饅頭製造時の生地発酵には、*E. cloacae* GAO、酵母とも小麦タンパク質中のグリアジンが強く関わっており、またタンパク分解酵素の作用する部位が *E. cloacae* GAOと酵母では異なることから、膨化した生地の形状の違いにつながっているものと推測された。

#### 4. 要 約

*E. cloacae* GAOを用いて饅頭を製造すると、酵母を用いたものより、表面がなめらかで、きめの細かいものができあがる。また生地の膨化の仕方が酵母と異なることから、生地発酵に関与するタンパク分解酵素の作用の部位が異なるものと推測された。この酵素の作用の違いを明らかにするため、小麦タンパク質のグルテン、グルテニン、グリアジンを基質として培養液に作用させ、分解したタンパク質の挙動をLowry法と

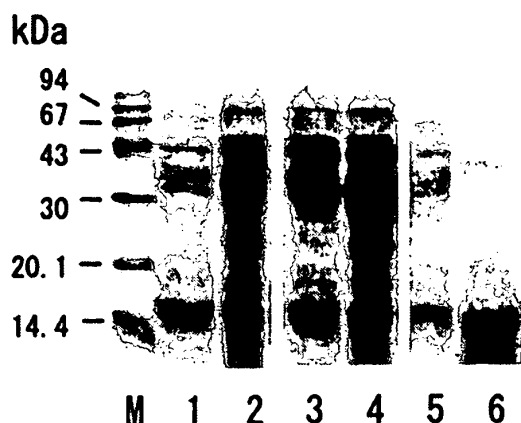
饅頭生地の膨化によぼす *Enterobacter cloacae* GAO の影響

Fig. 4. SDS-PAGE (15%) pattern of the culture broth with 5% gluten

M: marker proteins. The marker proteins used were phosphorylase-b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactoalbumin (14.4 kDa). 1, 2: *E. cloacae* GAO; 3, 4: yeast; 5, 6: G-medium; 1, 3, 5: 0 h; 2, 4, 6: 24 h.

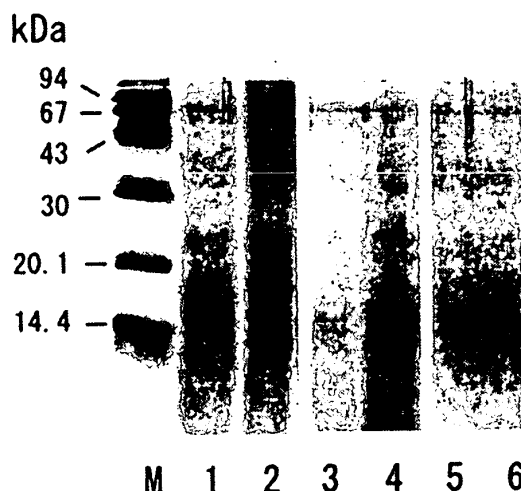


Fig. 5. SDS-PAGE (15%) pattern of the culture broth with 5% glutenin

M: marker proteins. The marker proteins used were phosphorylase-b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactoalbumin (14.4 kDa). 1, 2: *E. cloacae* GAO; 3, 4: yeast; 5, 6: G-medium; 1, 3, 5: 0 h; 2, 4, 6: 24 h.

電気泳動で確認した。その結果、Lowry 法においては、*E. cloacae* GAO、酵母ともグリアジンを基質にした場合に最も可溶化したタンパク質が多く認められた。電気泳動においても、グリアジンを基質にした場合、*E. cloacae* GAO では、18 kDa 付近に酵母には認められな

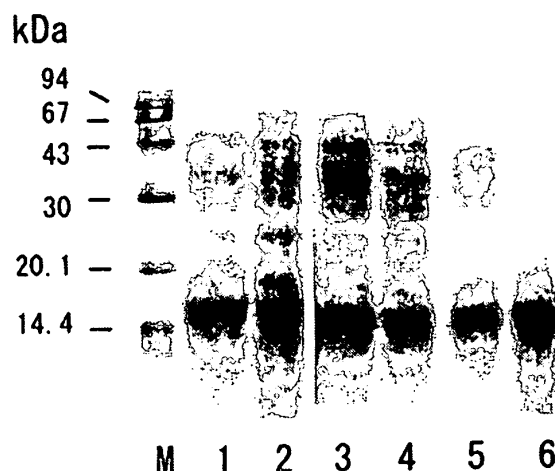


Fig. 6. SDS-PAGE (15%) pattern of the culture broth with 5% gliadin

M: marker proteins. The marker proteins used were phosphorylase-b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and  $\alpha$ -lactoalbumin (14.4 kDa). 1, 2: *E. cloacae* GAO; 3, 4: yeast; 5, 6: G-medium; 1, 3, 5: 0 h; 2, 4, 6: 24 h.

かった独自のバンドが検出された。電気泳動パターンに、*E. cloacae* GAO と酵母とで違いが認められたことから、生地膨化の際に、小麦タンパク質のグリアジンに作用する酵素の部位が *E. cloacae* GAO と酵母では異なっており、このことが膨化生地の形状の違いにつながっているものと推測された。

## 引用文献

- 1) 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉: 老麺法によるスターター調製とその一般的使用について, 家政誌, **38**, 865-869 (1987)
- 2) 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉: リンゴ浸漬水より分離した饅頭醗酵性細菌 (*Enterobacter cloacae*) の同定について, 農化, **61**, 357-359 (1987)
- 3) 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉: 老麺法発酵による生地および饅頭の加工特性, 家政誌, **40**, 221-225 (1989)
- 4) Nagano, H., Omori, M., and Shoji, Z.: Characteristics of Wheat-Flour Dough Using *Enterobacter cloacae* GAO with and without Yeast, *J. Food Sci.*, **56**, 106-108 (1991)
- 5) Tamura, A., Nagano, H., Omori, M., Shoji, Z., Iibuchi, S., and Arai, M.: Improvement in Hydrogen Productivity by a Leavening Bacterium, *Enterobacter cloacae* GAO, and Its Application to Mantou, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2137-2139 (1995)
- 6) 堀田 博, 原 利男: 連続水蒸気蒸留エーテル抽出法による茶香気成分の分析, 茶技研報, No. 66, 41-46

- (1984)
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 8) Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
- 9) 一島英治：『発酵食品への招待』, 裳華房, 東京, 89-92 (1989)
- 10) 長尾精一：『小麦の科学』, 朝倉書店, 東京, 93-98 (1995)
- 11) 田村朝子, 長野宏子, 中江美和, 大森正司, 庄司善哉, 荒井基夫： *Enterobacter cloacae* GAO における水素産生能と有機酸生成の検討, 家政誌, **51**, 157-161 (2000)