

氏 名	松下 耕基
本籍（国籍）	静岡県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 769 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	Research and Development of Novel Bread making Method by Enzymes for Bread Making（製パン用酵素利用による新規製パン法の研究・開発）
学位審査委員	主査 帯広畜産大学教授 山内 宏昭 副査 小田 有(帯広 教授), 永井 毅(山形 教授), 折笠 貴寛(岩手 准教授)

論文の内容の要旨

The utilization of bakery enzymes and high-pressure treatment could improve the bread making quality (BMQ) such as gas retention of dough (GRD), specific loaf volume (SLV), and staling rate of bread crumb. In addition, it is expected to improve the water absorption of dough and bread qualities by adding mashed potato (MP) to dough. On the other hand, it is necessary to experiment with a large number of combinations in order to determine the optimum conditions for the utilization of enzymes, high-pressure treatment, and MP. Thus, in this study, response surface model (RSMd) was created using the data acquired, based on the central composite face-centered design (CCF), and then the optimal conditions were determined by using an optimization technique (OT) with Solver (Excel add-in software). Finally, in order to validate the effectiveness of these methods, bread making experiments with determined condition were conducted, and the effectiveness of each combination was verified from the BMQ of the dough and various evaluations of the bread.

Chapter 2

The functional ingredients of whole grains, dietary fiber (DF), resistant starch, vitamins and minerals, have various physiological benefits related to “western diseases” such as coronary heart disease, colon cancer and diabetes. However, the product of whole grains is not attractive as those of white wheat flour because the higher amount of bran and germ contained in whole wheat flour reduce the quality and sensory value of final products. In bread making, the presence of bran and germ causes the deterioration of the dough-rheological properties, decrease in SLV, increase in crumb hardness and darkening of crumb appearance. Moreover, the addition of whole wheat flour gives different flavor profiles for whole wheat flour breads as compared with those of white flour bread. It is generally accepted as truth that the damaged starch (DS) and DF in flour have an influence on the gluten formation, resulting in decrease of BMQ. There are various kinds of enzymes used in baking as bread making improvers. Among them, α -amylase (AM) and hemicellulase (HC) are hydrolases having

activities for DS and insoluble pentosan, respectively. The objective of the study in Chapter 2 was to investigate the effects of whole wheat flour substitution and enzyme treatments using AM and HC on BMQ. Results showed that the addition of whole wheat flour produced dough with low GRD and SLV. However, AM and HC drastically improved both GRD and SLV of whole wheat flour substituted dough and bread by degrading DS and hemicellulose. Thus, these results indicated that the treatments with suitable enzymes could drastically improve the BMQ of dough made with whole wheat flour.

Chapter 3

In Chapter 3, response surface methodology (RSM) created a RSMd and Solver (Excel add-in software) calculated the optimal amounts of the enzymes. The optimal concentrations of AM and HC calculated using Solver were 0.128 and 0.100 g/100 g flour, respectively. Adding optimum concentrations of AM and HC drastically improved BMQ (GRD, SLV, and bread staling) of whole wheat flour dough and bread compared to whole wheat flour dough and bread without the enzymes. These results show that combining RSM and Solver is an effective and reasonably easy method that determines optimal concentrations of enzymes to obtain the highest quality bread when using whole wheat flour.

Chapter 4

A method for investigating the mechanical properties of bread crumb has been established in previous studies. However, there are few reports describing the effects of using whole wheat flour and the addition of enzymes (AM and HC) on the mechanical properties of bread crumb during storage. Therefore, in Chapter 4, we investigated the effects of storage on the properties of bread crumbs by using pullman scale bread making. Rupture force, rupture deformation and rupture energy were decreased using whole wheat flour, as the higher amount of insoluble DF in whole wheat flour disturbs the fine gluten network formation in dough, resulting in a weakened bread crumb structure. In comparison, the bread crumb made from the dough with whole wheat flour treated with enzymes had a lower rupture force, a higher rupture deformation and lower viscoelastic values compared with both the Control and bread crumb made from dough with whole wheat flour since AM and HC digest DS, insoluble DFs and gelatinized starch, which decrease BMQ, resulting in improved bread crumb texture. This study elucidates the effects of using whole wheat flour and the addition of enzymes on the mechanical properties of bread crumb during storage. The addition of enzymes made it possible to obtain high quality pullman bread using whole wheat flour.

Chapter 5

Potato is major crops globally and being produced widely in many countries of the world. In Japan, potato is also major agricultural crop and about 2.5 million tons are produced per year. Those are used for much utilization such as table food, processing and starch extraction, etc. However, potato is not used much in bread making in Japan and mainly used for other purposes, such as potato salad for sandwiches, than bread dough production. The bread substituted with MP instead of wheat flour have been attracting attention because of their added compositions such as gelatinized starch, DFs, vitamins, minerals, etc. that has a beneficial effect on bread's nutritional value, texture, flavor and taste. On the other hand, excess amount of DS and DFs in MP inhibits the gluten network formation in dough and

greatly deteriorates the BMQ. In Chapter 5, we investigated the optimal addition of two types of bakery enzymes, AM and HC, to improve the BMQ of MP-added dough. The reasonable optimum addition amount of the enzymes was determined using the RSM and OT. The optimal concentrations of AM and HC calculated using Solver were 0.059 and 0.050 g/100 g flour, respectively. As the results, the BMQ such as SLV and GRD, and the bread staling of MP dough and bread with optimal concentrations of AM and HC were remarkably improved compared to those without enzymes. These results showed that RSM and OT were effective methods to reasonably and easily derive the optimal concentrations of multiple enzymes, which resulted in obtaining the good quality MP-supplemented bread with high SLV, desirable texture, flavor and taste except of crust color.

Chapter 6

In recent years, the use of high-pressure processing technology, a new food processing method, has been increasing and is expected to become an alternative to heat treatment. High-pressure treatment is a technique that applies high hydrostatic pressure on food products during the processing to suppress the growth of bacteria and promote the immersion effect. Moreover, some enzymes are activated by applying high-pressure treatment and the process effectively distributes the enzymes uniformly throughout the food. The use of high-pressure treatment has also increased as a substitute for heat treatment and various products are being processed utilizing high-pressure treatment. In Chapter 6, we investigated the effect of combining bakery enzyme and high-pressure treatment on dough qualities. The optimal concentration of bakery enzymes and high-pressure level were determined using RSM and OT. Bread dough was prepared by the optimal condition, 0.200% of bakery enzyme and 43MPa of high-pressure treatment, and the bread dough was then baked. Optimal combining bakery enzyme and high-pressure treatment drastically improved BMQ such as increased SLV, higher concentrations of reducing sugar, and lower concentrations of DS and insoluble DF compared to the Control and to those that were only treated with bakery enzymes or high-pressure treatment, respectively. In addition, the bread with both bakery enzymes and high-pressure treatment showed improved micro structure in the crumb and maintained freshness longer during storage.

(和文)

製パン用酵素や高圧処理の利用により、生地ガス保持性(GRD)、比容積(SLV)、パンの老化等の製パン性(BMQ)改善が期待できる。さらに、馬鈴薯マッシュ(MP)をパン生地に添加することで、生地の吸水率が増加し、パンの品質向上に繋がると考えられる。一方で、製パン用酵素添加量、圧力処理、MP 添加量の最適条件の決定には、膨大な数の製パン試験が必要である。そこで、本研究では、中心複合計画(CCF)に基づき取得したデータから応答曲面モデル(RSMd)を導出し、ソルバー (Excel アドインソフトウェア) による最適化手法(OT)によって最適条件を算出した。また、以上の手法の有用性の評価のため、算出した条件下での製パン試験を行い、本手法から得られた条件に従って作成したパン生地及びパンの **BMQ** を検討した。

第 2 章

小麦粉の全粒粉には豊富な食物繊維(DF)、難消化性澱粉、ビタミンおよびミネラルなどの機能性成分が含まれており、冠状動脈性心臓病、結腸癌、糖尿病のような欧米病に関して色々な生

理機能を有している。しかし、全粒粉に含まれるふすまおよび胚芽の量が多いと最終製品の品質と嗜好性が低下するため、全粒穀物の製品は精白粉の製品と比較して品質的に劣るとされている。製パンにおいて、ふすまおよび胚芽の存在は、生地のリオロジー特性の劣化、SLV の減少、保存中のパン老化速度の増加およびクラム外観の劣化を引き起こす。さらに、全粒粉の添加により、全粒粉パンは白粉パンと比較して異なる風味を有する。一般的に小麦粉に含まれる損傷澱粉 (DS) と DF がグルテン形成に影響を及ぼし、その結果、BMQ が低下するとされている。製パンにおいて、製パン性の向上を目的として様々な種類の酵素が用いられる。その中でも、 α -アミラーゼ (AM) およびヘミセルラーゼ (HC) は、それぞれ DS および不溶性ペントサンに対し活性を持つ加水分解酵素である。第 2 章の研究の目的は、AM および HC の添加と全粒粉の使用が BMQ に及ぼす影響を検討することとした。結果として、全粒粉の添加により、GRD および SLV が低下した。しかし、AM と HC の添加により、生地中の DS とヘミセルロースが分解され、全粒粉のみ添加した生地と比較して GRD と SLV が劇的に改善された。以上の結果から、適切な酵素添加により全粒粉を使用した生地の BMQ の劇的な改善が可能であることが明らかとなった。

第 3 章

第 3 章では、応答曲面法 (RSM) により 2 種の酵素添加全粒粉生地の比容積変化に関して RSMd を作成し、ソルバー (Excel アドインソフトウェア) を用いてこれらの酵素の最適添加量を算出した。ソルバーを使用して算出された AM および HC の最適濃度は、それぞれ 0.128 および 0.100 g / 100 g 小麦粉だった。最適濃度の AM と HC の添加により、酵素を含まない全粒粉の生地やパンと比較して、BMQ (GRD、SLV およびパンの老化速度) が劇的に改善された。以上の結果より、RSM とソルバーを組み合わせて用いる手法は、高品質な全粒粉パンを得るための酵素の最適濃度を決定するために効果的で合理的な方法であることが明らかとなった。

第 4 章

パンの物性を分析する方法は、以前の研究において確立されている。しかし、酵素 (AM および HC) や全粒粉の添加が保存中のパンの物性変化に与える影響を検討した報告はほとんどない。そこで、第 4 章では、プルマンスケールの製パンによって、全粒粉添加パンの物性に対する保存の影響を検討した。全粒粉に豊富に含まれる不溶性 DF により、生地中の良好なグルテンネットワークの形成が妨げられ、パン生地の構造が弱くなる。そのため全粒粉を使用すると、破断力、破断変形、および破断エネルギーが減少した。一方で、AM および HC を添加した全粒粉生地から作製したパンは、対照や酵素を含まない全粒粉生地から作製したパンと比較して、破断力が低く、破断変形が大きく、粘弾性係数が低い値を示した。AM と HC は BMQ を低下させる要因である DS、不溶性食物繊維、糊化デンプンを分解し、パンの物性を改善することが判った。この研究により、貯蔵中のパンの物性に対する全粒粉の使用と酵素添加の影響が明らかとなった。酵素の添加により、全粒粉を使用した高品質プルマン型食パンの作製が可能となった。

第 5 章

ジャガイモは世界的に主要な作物であり、世界の多くの国で広く生産されている。日本におい

ても、ジャガイモは主要な農作物であり、年間約 250 万トンが生産されており、テーブルフード、加工、澱粉抽出などの多くの目的に応じて使用されている。しかし、ジャガイモは製パンにはあまり用いられず、主にパン生地以外のサンドイッチ用のポテトサラダなどの他の目的に使用される。一方で、小麦粉の代わりに MP を使用したパンは、パンの栄養価、食感に有益な効果をもたらす糊化澱粉、DF、ビタミン、ミネラルなどの成分が付与され、高品質なパンであると期待される。しかし、MP 中の過剰な量の DS および DF は、生地中のグルテンネットワーク形成を阻害し、BMQ を大きく低下させる。そこで、第 5 章では、MP が添加された生地の BMQ を改善するために、AM と HC の 2 種類の製パン用酵素の最適添加量について検討した。酵素の最適添加量は、RSM および OT を使用して決定した。ソルバー（Excel アドインソフトウェア）を使用した OT で計算された AM および HC の最適濃度は、それぞれ 0.059 および 0.050 g / 100 g 小麦粉だった。結果として、最適濃度の AM と HC を添加した MP 生地とパンは酵素を使用しない場合と比較して、GRD、SLV およびパンの老化速度が著しく改善された。以上の結果は、RSM と OT が酵素の最適濃度を合理的かつ容易に導き出すための有効な方法であり、それにより高い SLV、望ましいテクスチャー、香り、味を備えた高品質の MP 添加パンを得ることが可能であることを示した。

第 6 章

近年、新しい食品加工法である高圧加工技術の利用が増加しており、熱処理の代替品になると期待されている。高圧処理は、加工中に食品に高い静水圧を加えて細菌の増殖の抑制や、浸漬効果を促進する技術である。さらに、一部の酵素は高圧処理することで活性化され、また、酵素を食物全体に効果的に均一に浸透させることで加工効率も向上する。高圧処理により製パン用酵素の活性が向上し、BMQ を改善する効果的な手段になることが期待される。第 6 章では、製パン用酵素と高圧処理の組み合わせがパン生地特性に与える影響に関して検討した。最適な製パン用酵素濃度と高圧処理条件は、RSM と OT を使用して決定した。製パン用酵素剤は 0.200%、高圧処理条件は 43MPa が最適であると算出され、その後の製パンに用いられた。最適条件の酵素剤添加と高圧処理された生地において、対照および製パン用酵素剤添加または高圧処理のみされたものと比較して、SLV の増加、生地中の還元糖の増加、DS および不溶性 DF の減少など、BMQ が劇的に改善された。さらに、製パン用酵素剤と高圧処理を併用したパンは、改善されたパンクラムの微細構造を示し、保存中も焼き立ての食感を長く維持した。

論文審査の結果の要旨

本論文では、製パン用酵素を有効に用いて通常では品質良好なパンの製造が困難な各種のパン類について、顕著に品質良好なパン類の製造を可能にする研究・開発が行われた。また、これらの研究・開発の過程で最適製パン用酵素の添加によって各種低製パン性パン生地の製パン性が劇的に改善されるメカニズムについても、種々の生地、パン中の成分の分析、物性解析を通じて明らかにした。更に、最適製パン用酵素の添加量を合理的、簡便に導出する方法として、まず、実験計画としての中心複合計画、応答曲面法を用いて、複数の酵素の添加量と生地の製パン性の関係を数式モデル化した。次に、本モデルを用いて最適化手法を用いて、合理的、簡便にそれらの最適添加量を求める手法を開発し、これらの手法を各種製パン法に応用し、その

有効性を実際の製パン実験データから明らかにした。

第1の研究・開発では、食物繊維等高含有で健康機能性が期待できる全粒粉添加生地の低製パン性の改善について検討された。まず、製パン用酵素（ α -アミラーゼ、ヘミセルラーゼ）添加により本生地の製パン性が顕著に改善されることを明らかにし、その主な要因が酵素分解反応に伴う生地中の損傷デンプン、ヘミセルロース含量の低下であることを突き止めた。次に、本2種の酵素の最適添加量を中心複合計画、応答曲面法、最適化手法を用いて明らかにし、その有効性を実際の製パン実験により検証した。更に、この最適酵素添加条件で角型食パンを製造し、最適酵素添加の効果を詳細なパンクラムの物性評価等から明確にした。

学位論文の基礎となる学術論文

1. **K. Matsushita**, D.M. Santiago, T. Noda, K. Tsuboi, S. Kawakami, and H. Yamauchi (2017). The bread making qualities of bread dough supplemented with whole wheat flour and treated with enzymes. *Food Science and Technology Research*, 23 (3): 403-410.
2. **K. Matsushita**, A. Terayama, D. Goshima, D. M. Santiago, T. Myoda, and H. Yamauchi (2019). Optimization of enzymes addition to improve whole wheat bread making quality by response surface methodology and optimization technique. *Journal of Food Science and Technology*, 56 (3): 1454-1461.
3. **松下耕基**, 寺山采花, 五嶋大介, 高田兼則, 山内宏昭 (2019). 角型食パンの品質特性に対する全粒粉使用と酵素添加の影響. *日本食品科学工学会誌*, 66 (6): 201-209.
4. **K. Matsushita**, J. Iwata, D. Goshima, D.M. Santiago, T. Nakamura, and H. Yamauchi (2019). Bread making improvement of mashed potato-supplemented dough by treating with optimal bakery enzymes. *Food Science and Technology Research*, 25 (2): 245-255.
5. **K. Matsushita**, A. Tamura, D. Goshima, D.M. Santiago, T. Myoda, K. Takata, and H. Yamauchi (2019). Effect of combining additional bakery enzymes and high pressure treatment on bread making qualities. *Journal of Food Science and Technology*, Online: 1-9.