(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 9 月 27 日(27.09.2012)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/128186 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/18 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2012/056751

(22) 国際出願日: 2012 年 3 月 15 日(15.03.2012)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2011-061496 2011 年 3 月 18 日(18.03.2011) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島３－２－４ Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 出海　卓也 (IZUMI Takuya) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８　株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 高田　尚寛 (TAKATA Takahiro) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８　株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 高田　勇人 (TAKATA Hayato) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町１－８　株式会社カネカ内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 柳野　隆生, 外 (YANAGINO Takao et al.); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原１－１５－１、ノスクマードビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii)）

(54) **Title**: NOVEL BAKER'S YEAST

(54) 発明の名称 : 新規パン酵母

(57) **Abstract**: Provided is a baker's yeast which sustains a high fermentability in a dough with a wide sugar content range, i.e., from a low sugar content area to a high sugar content area, even after storing as a fresh yeast in a refrigerated state for a long time, and which has an excellent storage stability of the fermentability, i.e., when cells thereof are stored in a refrigerated state for a long time and then used in a frozen dough, a high fermentability is achieved after thawing. Moreover, the baker's yeast provided above facilitates not only the production process of bread but also a delivery system or stock control of starting materials and, therefore, enables the construction of a system whereby bread with high qualities can be produced more easily and more stably.

(57) 要約:　生イースト状態で長期冷蔵保存しても、低糖域から高糖域までの広い糖域の生地において高い発酵力を有し、さらに長期冷蔵保存した菌体を冷凍生地に使用した場合においても解凍後の発酵力が高いこと、即ち発酵力保存安定性の高いパン酵母、さらにパンの製造工程だけでなくデリバリーシステムや原材料在庫管理を容易にし、高品質のパンをより容易に安定生産できるシステムを構築可能とするパン酵母を提供する。

WO 2012/128186 A1

明　細　書

発明の名称 ： 新規パン酵母

技術分野

[0001] 本発明は、新規なパン酵母及びこれを利用したパン生地、さらにはそれらの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 製パンに際し通常使用されるパン酵母所謂イーストは、湿菌体状態で水分が概ね６０～７０％の生イーストと称される形態と、乾燥菌体状態で水分が１０％以下のドライイーストと称される形態、あるいは菌体の水懸濁液状態のクリームイーストと称される形態に大別される。このうち、生イーストは製パン初期の発酵が極めてスムーズな点や、一般的な冷蔵設備での保存が容易な点などから、非常に使い易く最も広く使用されている形態である。イーストはまさしく生き物であり、最も自然な状態で圧搾し固形状にしているだけの生イースト、あるいはクリームイーストの発酵機能を安定維持するためには、冷蔵保存が必要となるが、冷蔵と言えども保存が長期になると発酵機能の低下は明らかであり、賞味期限を概ね３週間から４週間までにする事で一般的に使用管理されてきた。

[0003] 一方、どうしても長期保存が必要な場合は、ドライイーストを使用する必要があるが、分散性の問題や冷水との接触を極力避ける必要がある。また、乾燥工程を必要とするドライイーストはコスト面でも生イーストに劣るのが現状である。

[0004] 長期冷蔵保存後の生イーストの発酵機能についても、高糖濃度生地や冷凍生地における長期保存での機能低下が著しく、これまでは生イースト状態で冷蔵保存日数が４週間を超える長期保存中に於いて発酵機能が安定維持される、即ち発酵力保存安定性を有する菌株は報告されてこなかった。

[0005] 個々のパン酵母に特徴的な発酵力は、複数の遺伝子が様々な関連性を持って発現する総合的な機能であり、ガス発生量においても菌株間機能差が存在

する。例えば、マルトース資化関連遺伝子の発現は無糖生地発酵との関連性が高く、インベルターゼ活性関連遺伝子の発現は高糖生地発酵との関連性が高く、それぞれは別形質として捕らえられてきた。また、パン生地冷凍後の発酵の強さも非冷凍での発酵力とは全く別の冷凍生地発酵力、所謂耐冷凍発酵力として考えられ、多くの遺伝子の関与が示唆されてきた。こういった中で、各々の形質を強化したパン酵母が開発されてきたものの、生イースト状態での長期冷蔵保存後の発酵力に着目した菌株開発はない。

[0006] 例えば、３０重量部（対粉）を超える糖配合領域で発酵力の高い酵母として、４０重量部（対粉）程度の糖配合で製パン可能なパン酵母（特許文献１）、或いはストレート法と中種法での耐砂糖性と耐浸透圧性の高いパン酵母（特許文献２）が示されているが、何れも長期冷蔵保存後の発酵力、所謂発酵力保存安定性に関しては示されておらず示唆もない。加えて、発酵力保存安定性の高い生イーストを長期冷蔵保存した後、高糖生地よりもストレス強度が強いと考えられる冷凍生地に使用した場合の解凍後の発酵力に関しては示されておらず、高糖生地発酵力と耐冷凍発酵力を併せ持つパン酵母（特許文献２、特許文献３）も示されてきたが、その機能が長期冷蔵保存中に於いて安定維持される、所謂発酵力保存安定性を有する菌株は示されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開２０００－２６２２７５号公報

特許文献2：国際公開第０１／０２１７６３号

特許文献3：特開２０００－２７９１６５号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 発酵力保存安定性を有するパン酵母、特には高糖生地発酵力及び耐冷凍発酵力の発酵力保存安定性を大幅に改善したパン酵母が、パンの製造工程だけでなくデリバリーシステムや原材料在庫管理を容易にし、高品質のパンを安

定生産できるパン酵母として望まれている。また、該パン酵母は、強いストレス環境に高い耐性を獲得させる為に、他の機能性の低下を来す事があってはならず、さらには１つのパン酵母で無糖生地や低糖生地における充分な発酵機能も併せ持ち、いろいろなパン生地において使用可能であることが望ましい。

[0009] そこで本発明の目的は、生イースト状態で長期冷蔵保存しても、低糖域から高糖域までの広い糖域の生地において高い発酵力を有し、さらに長期冷蔵保存した菌体を冷凍生地に使用した場合に於いても解凍後の発酵力が高いこと、即ち発酵力保存安定性の高いパン酵母、該パン酵母を用いてなるパン生地及び該生地を焼成してなるパンを提供することである。

また、本発明は、パンの製造工程だけでなくデリバリーシステムや原材料在庫管理を容易にし、高品質のパンをより容易に安定生産できるシステムを構築可能とするパン酵母の提供も目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、自然界より分離した菌株や交雑により作製した育種菌株を適宜培養し、生イースト状態に脱水せしめた後、所定の虐待保存試験により菌株選択を実施して得られたイーストは、生イースト状態で長期冷蔵保存しても無糖生地及び高糖生地において高い発酵力を有し、さらに長期冷蔵保存した菌体を含有する生地を冷凍保存してから製パンに使用した場合に於いても、解凍後の発酵力が高いことを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 即ち、本発明の第一は、サッカロミセス・セレビシエに属するパン酵母の交雑株を生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、下記表１の配合で、無糖及び高糖のパン生地を作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上、かつ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上、更には下記表２の配合で高糖のパン生地を作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した高糖生地Ｂを、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であることを指標に選択して得られるサッカロミ

セス・セレビシエに属するパン酵母に関する。

[0012] [表1]

生地発酵力測定の配合と工程

		無糖生地	高糖生地A
配合	小麦粉	100g	100g
	上白糖	0g	40g
	食塩	1．5g	0．5g
	パン酵母(65%湿菌体)	4g	4g
	水	65mL	47mL
条件	ミキシング	3分	3分
	分割量	20g	20g
	ガス発生量測定	38℃ 2時間	38℃ 2時間

[0013] [表2]

高糖生地冷凍耐性測定の配合と工程

		高糖生地B
配合	小麦粉	100g
	上白糖	25g
	食塩	0．5g
	パン酵母(65%湿菌体)	6g
	水	54mL
条件	ミキシング	3分
	分割量	20g
	前発酵	30℃で、90分間
	冷凍	−20℃で、2週間
	解凍	25℃で、30分間
	ガス発生量測定	38℃で、2時間

[0014] 好ましい実施態様は、前記の選択に用いるパン酵母が、

サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表１の配合で高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が５７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株とを交雑して第一世

代交雑株を作製し、前記第一世代交雑株を生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上かつ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となることを指標に菌株を選抜した後、該菌株を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜して一次スクリーニングを実施し、第一世代交雑株から複数株を選択し、前記選択された複数の第一世代交雑株を胞子形成させて交雑して得られる第二世代交雑株である上記記載のパン酵母に関する。

[0015] 好ましい実施態様は、サッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２１７（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５８）又はサッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２２２（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５９）である上記記載のパン酵母に関する。

[0016] 本発明の第二は、上記記載のパン酵母を有する生地に関する。

[0017] 本発明の第三は、上記記載の生地から焼成して得られるパンに関する。

[0018] 本発明の第四は、上記記載のパン酵母の製造方法であって、（１）サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表１の配合で高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が５７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、を交雑して第一世代交雑株を作製する工程、（２）前記第一世代交雑株を生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上かつ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となることを指標に菌株を選抜した後、該菌株

を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜して一次スクリーニングを実施し、第一世代交雑株から複数株を選択する工程、（３）前記工程で選択された複数の第一世代交雑株を胞子形成させ、交雑して第二世代交雑株を作製する工程、（４）前記第二世代交雑株を生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で二時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上、かつ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上、さらには前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵したあと２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜する二次スクリーニングを実施する工程を含むことを特徴とするパン酵母の製造方法に関する。

発明の効果

[0019] 本発明に従えば、生イースト状態で長期冷蔵保存しても、低糖域から高糖域までの広い糖域の生地において高い発酵力を有し、さらに長期冷蔵保存した菌体を冷凍生地に使用した場合に於いても解凍後の発酵力が高いこと、即ち発酵力保存安定性の高いパン酵母を提供することができる。またさらに、パンの製造工程だけでなくデリバリーシステムや原材料在庫管理を容易にし、高品質のパンをより容易に安定生産できるシステムを構築可能とするパン酵母を提供できる。

また、前記パン酵母を用いることで、冷蔵保存又は冷凍保存した後でも十分な発酵力があり、パンを作製するのに好適な生地を提供できる。

また、本発明に従えば、前記特徴を有するパン酵母を効率よく得ることができる。

また、本発明に従えば、前記生地を用いることで、冷蔵保存、冷凍保存などの保存状態に関わらず、ボリュームが十分にある高品質のパンを製造することができる。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明につき、さらに詳細に説明する。本発明のパン酵母は、特定の指標を基に選択して得られ、サッカロミセス・セレビシエに属し、生イースト状態で長期冷蔵保存しても、広糖域の生地において高い発酵力を有し、さらに長期冷蔵保存した菌体を含有する生地を冷凍保存してから製パンに用いた場合に於いても解凍後の発酵力が高い、即ち発酵力保存安定性が高い。

[0021] まず、本明細書において使用される用語については、以下に特に説明する場合を除いて、当分野で通常使用される用語の意味と同一である。本明細書において、糖配合割合を含め、製パン主副原料の配合割合（対粉、重量部）は、全生地中の小麦粉量１００重量部に対する配合量（重量部）であり、該配合量を製パン主副原料の配合割合（重量部）とする。

[0022] 本発明において、長期冷蔵保存とは、具体的には約５℃に保たれた冷蔵庫で６週間保存された状態を示し、生イースト状態で長期冷蔵保存しても、広糖域の生地において高い発酵力を有するパン酵母は、０℃～１０℃の温度域で４週間を超える保存後においても広糖域の生地において高い発酵力を有する。

また、本発明において、冷凍保存とは、具体的には約－２０℃に保たれた冷凍庫で保存された状態を示す。

[0023] 本発明において、始発菌体とは長期冷蔵保存前の生イースト状態の菌体であり、製造後３日以内の菌体を言う。

[0024] 本発明のパン酵母は、生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、前記表１の配合で糖０重量部のパン生地（無糖生地）及び糖４０重量部のパン生地（高糖生地Ａ）を作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上且つ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上であることが好ましい。より好ましくは、無糖生地で４５ｍＬ以上且つ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上である。

また該パン酵母は、生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、前記表２の配合で糖２５重量部のパン生地（高糖生地Ｂ）を作製し、３０℃で９０分間前発酵した後冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分解凍処理

した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であることが好ましく、より好ましくは、１５５ｍＬ以上である。

なお生イースト状態とは、湿菌体状態で水分が概ね６０～７０重量％のパン酵母のことを言う。

[0025] 無糖生地や高糖生地Ａで一定量以上の発酵力があれば、広糖域のパン生地において高い発酵力を有していると言え、高糖生地Ｂを２週間冷凍後も一定量以上の発酵力があれば、高糖生地での耐冷凍発酵力があると言える。

[0026] なお、本発明における発酵力は、ファーモグラフ（登録商標）ＩＩ（アトー株式会社製）を用いて、３８℃で２時間測定する生地２０ｇのガス発生量を発酵力とする。冷凍生地では、前記と同様にして、冷凍生地２０ｇを２５℃で３０分解凍した後、３８℃で２時間測定する生地２０ｇのガス発生量を発酵力とする。

[0027] 一般に、生地発酵力を培養条件などで高め過ぎた菌株は、作製時点の菌体活性が高い為、そのような状態の菌体は、様々なストレスに対して耐性が低く、また保存中の活性、所謂発酵力や保存安定性についても低下しやすい。特に、ストレス強度の高い高糖生地や冷凍生地において、発酵力を長期にわたって維持するパン酵母を開発することは容易ではないが、生地発酵力だけが長期に安定であっても発酵力保存安定性を有するパン酵母としては充分と言えず、冷凍生地に使用される場合においても強い発酵力を示すことが好ましい。

[0028] 本発明の発酵力保存安定性を有するパン酵母は、自然界や交雑株のサッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cereviciae）からのスクリーニング（選択）及びパン酵母の育種技術である交雑、変異処理、細胞融合などの手法によって得ることができる。

[0029] 上記手法の内、例えば以下の方法により得ることができる。交雑には、自然界の土壌、河川、果実などから単離したサッカロマイセス・セレビシエ保存菌株から胞子株を取得し、数々の組み合わせで交雑株を作製し、該交雑株をスクリーニング用菌体とする。

[0030] なお、前記保存菌株の単離には一般的な真菌用寒天培地を用いる。また、前記胞子株は、単離された保存菌株から常法に従って胞子形成培地を用いて形成させる。また、前記交雑株は、常法に従って前記胞子株から出芽した一倍体の胞子同士をランダムに接合させることで得る。

[0031] ＜交雑育種＞

前記サッカロミセス・セレビシエに属する自然界の土壌、河川、果実などから単離した保存菌株から胞子株を取得し、これら胞子株を使用して数々の組み合わせで交雑株を作製する。作製した数々の交雑株を下記のスクリーニング用菌体作製法により培養する。

[0032] ＜スクリーニング用菌体作製＞

・バッチ培養

表３の組成の培地を大型試験管に５ｍＬ、５００ｍＬ坂口フラスコに５０ｍＬ分注し、オートクレーブ殺菌した後、培養に使用する。育種株１白金耳を大型試験管に全量植菌し、３０℃、１日間振とう培養後５００ｍＬ坂口フラスコに継植して、さらに３０℃、１日間振とう培養により作製したバッチ培養菌体を以下の５Ｌジャーの種母培養に供する。なお、培地の調製の際に、糖は糖蜜を使用し、糖濃度４％（重量／体積）分になるよう調整する。

[0033] [表3]

試験管種母及びフラスコ種母の培地組成

糖(糖蜜として)	4.0%
尿素	0.3%
硫酸アンモニウム	0.08%
燐酸2水素アンモニウム	0.04%
硫酸亜鉛	5ppm

水でﾒｽｱｯﾌﾟ後の培地全体中の重量比。

[0034] ・５Ｌジャー種母培養

５Ｌジャーに表４の組成の培地２Ｌを入れて、オートクレーブ殺菌後、５００ｍＬ坂口フラスコ５本分の菌体を植菌し表５の条件で種母培養を行う。

なお、培地の調製の際に、糖は糖蜜を使用し、糖濃度４％（Ｗ／Ｖ）分になるよう調整する。

[0035] [表4]

5Lジャー種母の培地組成

糖(糖蜜として)	90g
尿素	6．75g
硫酸アンモニウム	1．8g
燐酸2水素アンモニウム	0．9g
硫酸亜鉛	11．25mg
水	2250mLにメスアップ

[0036] [表5]

5Lジャー種母の培養条件

種母量	フラスコ培養種母250mL
通気	2．5nL／min
撹拌	650rpm
温度	33℃
pH下限値	4．7コントロール (14%アンモニア水使用)

[0037] ・５Ｌジャー本培養

始発液量を表６の培地組成で、５Ｌジャーで培養した種母菌体を湿菌体として５０ｇ添加し、表７の条件で本培養を行う。具体的には１３時間培養を行い、糖は分割添加する。

５Ｌジャー培養菌体は、培養終了後直ちに遠心分離し、吸引脱水し湿菌体を作製し、以下のスクリーニングに使用する。

なお、本発明でのスクリーニングにおいて発酵力を測定する際には、各生地のパン酵母規定量で作製したパン生地からのガス発生量を測定し、その値を該湿菌体の発酵力とする。ここで、本発明におけるパン酵母規定量の数値は、６５％湿菌体の使用量として記載しており、実際に水分含量が違うパン

酵母（湿菌体）を用いる際には、パン酵母の純分量があうように使用し、水の量は実際の湿菌体の水分含量にあわせて添加量を調整する。

[0038] [表6]

5Lジャー本培養の培地組成

糖（糖蜜として）	250g
尿素	5. 0g
75%燐酸	1. 5mL
硫酸亜鉛	20mg
ビタミンB1	10mg
水	2L

[0039] [表7]

5Lジャー本培養の培養条件

種母量	湿菌体50g
通気	2. 5nL／min
撹拌	650rpm
温度	33℃
pH下限値	5. 0コントロール （14%アンモニア水使用）

[0040] ＜スクリーニング＞

一次スクリーニングとして、まず最初に、前記湿菌体を生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上且つ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となる株を選抜した後、前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後－２０℃で冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に一次スクリーニング株を選択する。選択された一次スクリーニング株から、生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上且つ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上、且つ６週間冷蔵保存の後、前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後－２０℃で冷凍し、２

週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１４５ｍＬ以上であることを指標に選抜して二次スクリーニング株が得られる。

[0041] 本発明のパン酵母として、上記方法により選択して得られたサッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２１７は受託番号「ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５８」、サッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２２２は受託番号「ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５９」として、独立行政法人製品評価技術基盤機構　特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２丁目５番地８）に２０１１年２月２１日（原寄託日）付けで寄託されている。

[0042] 前記で得られたパン酵母は、常法に従って、ドライイーストの形態に調整しても良い。

実施例

[0043] 以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例において「部」や「％」は重量基準である。また菌株としては、本発明による菌株と、対照菌株として株式会社カネカから市販されているパン酵母２株（ＳＧ、ＧＡ）と、オリエンタル酵母工業から市販されているパン酵母１株（ＵＳ）を用いた。

[0044] ＜生地発酵力測定法＞

実施例・比較例のパン酵母は、後述の所定の条件で保存した。前記表１に従って、小麦粉として日清製粉の強力粉「カメリヤ」（登録商標）を使用し、規定量の糖と水あるいは食塩を糖懸濁液として調製し、該パン酵母とともにホバート卓上ミキサーで生地をミキシングし、ミキシング後の本捏生地２０ｇのガス発生量を、ファーモグラフ（登録商標）ＩＩを用いて、３８℃で２時間測定し、その積算ガス量を各パン酵母の生地発酵力とした。

[0045] ＜耐冷凍発酵力測定法＞

実施例・比較例で得られたパン酵母は、生イースト状態で６週間冷蔵保存した。前記表２に従って、小麦粉として日清製粉の強力粉カメリヤを使用し、規定量の糖と水あるいは食塩を糖懸濁液として調製し、該パン酵母とも

にホバート卓上ミキサーで生地をミキシングし、ミキシング後の本捏生地２０ｇを３０℃で９０分間前発酵させた後－２０℃で冷凍し、冷凍生地とした。該冷凍生地は、－２０℃で２週間冷凍保存した後、２５℃で３０分間解凍した後、ファーモグラフ（登録商標）ＩＩを用いて、３８℃で２時間ガス発生量を測定し、その積算ガス量を各パン酵母の耐冷凍発酵力とした。

[0046] （実施例１～３、比較例１～３） 交雑育種と菌株選択

自然界より分離した菌株や交雑により作製した当社サッカロミセス・セレビシエ保存菌株（ＧＡ）より高糖生地発酵力の高い菌株、及び耐冷凍発酵力の高い菌株を元株として使用した。

[0047] 前記ＧＡ同等以上の高糖生地発酵力の高い元株は、以下のようにして得た。

まず、長期冷蔵保存前の生イースト状態であるＧＡを用いて、前記表１の配合で高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間発酵させて発酵力を測定した（５７ｍＬ）。

次に、土壌、池、川などの自然界より常法にしたがって分離しておいた多数のサッカロミセス・セレビジエに属するパン酵母をＧＡと同様にして高糖生地発酵力を測定し、前記ＧＡの高糖生地発酵力と比べて同等かより高い数値を示した菌株を３０株選択してこれを元株とした。

なお、自然界より分離したパン酵母は、以下の冷凍発酵力の高い菌株を選択する際にも使用した。

[0048] 前記ＧＡ同等以上の耐冷凍発酵力の高い菌株は、以下のようにして得た。

まず、長期冷蔵保存前の生イースト状態であるＧＡを用いて、前記表２の高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵させた後、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理したあと、３８℃で２時間発酵させて発酵力を測定した（１４７ｍＬ）。

次に、土壌、池、川などの自然界より常法にしたがって分離しておいた多数のサッカロミセス・セレビジエに属するパン酵母をＧＡと同様にして耐冷凍発酵力を測定し、前記ＧＡの耐冷凍発酵力と比べて同等かより高い数値を

示した菌株を３０株選択してこれを元株とした。

[0049] これらの元株はいずれも２倍体であるため胞子形成培地（組成：酢酸カリウム０．３%,、寒天１．５%）で胞子を形成させ、次のステップで交雑育種と菌株選択を実施した。

（１）ＧＡ同等以上の高糖生地発酵力を示す菌株から作製した胞子株と、ＧＡ同等以上の耐冷凍発酵力を示す菌株から作製した胞子株を各々交雑し、多数の第一世代交雑株を作製した。

（２）第一世代交雑株からは、前記元株の場合と同様の評価に加え、生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で糖０重量部及び糖４０重量部のパン生地（無糖生地及び高糖生地Ａ）を作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上且つ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となる株を選抜した後、前記表２の配合で糖２５重量部のパン生地（高糖生地Ｂ）を作製し、３０℃で９０分間発酵した後冷凍し、－２０℃で２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に一次スクリーニングを実施し、第一世代交雑株から２０株を選択した。

（３）生地発酵力と耐冷凍発酵力そして保存発酵力の各々の向上を狙い、更に第一世代交雑株から再度胞子形成させ、胞子株を各々交雑して第二世代交雑株を作製した。

（４）第二世代交雑株からは、一次スクリーニングに加え、冷蔵庫（約５℃）で６週間の長期冷蔵保存後も、前記表１の配合で、無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上、かつ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上であり、かつ前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後－２０℃で２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であること、即ち発酵力保存安定性の有無を指標にした二次スクリーニングを実施し、前記のＫＣＹ１２１７株（実施例１）及びＫＣＹ１２２２株（実施例２）に加えて、サッカロミセス・セレビジエＫＣＹ１２２

９株（実施例３）を取得した。それらの結果は、表８，９にまとめた。

[0050] [表8]

一次スクリーニング保存発酵力

	使用パン酵母	無糖生地発酵力		高糖生地A発酵力		高糖生地B冷凍耐性	
		始発	30℃ 24時間後	始発	30℃ 24時間後	始発	30℃ 24時間後
比較例1	SG	33	33	71	67	147	145
比較例2	GA	135	132	57	50	147	144
比較例3	US	-	-	-	-	-	-
実施例1	KCY1217	115	113	78	75	168	165
実施例2	KCY1222	103	101	94	90	184	182
実施例3	KCY1229	110	103	76	69	173	169

[0051] [表9]

二次スクリーニング保存発酵力

	使用パン酵母	無糖生地発酵力		高糖生地A発酵力		高糖生地B冷凍耐性	
		始発	5℃ 6週間後	始発	5℃ 6週間後	始発	5℃ 6週間後
比較例1	SG	33	30	71	61	147	142
比較例2	GA	135	128	57	34	147	135
比較例3	US	-	131	-	28	-	128
実施例1	KCY1217	115	111	78	66	168	159
実施例2	KCY1222	103	99	94	70	184	178
実施例3	KCY1229	110	105	76	65	173	166

[0052] （実施例４～６，比較例４～６） 製パン試験

表１０に示す製パン配合処方により、冷蔵庫（約５℃）で６週間冷蔵保存の後の菌株の耐冷凍発酵力を評価した結果を、表１１に示す。

表１１の結果から、実施例４～６で焼成して得られたパンは、１週間又は３ヶ月間冷凍した場合のいずれにおいても、比較例４～６で焼成して得られたパンと比べて、ボリュームが有意に大きなものとなっていた。

したがって、本発明の酵母は、市販の酵母菌３株に比べると、長期冷蔵保存後の菌体を用いて作製したパン生地１週間から３ヶ月の長期間冷凍した場合においても、充分なパンボリュームとする機能性を示していることがわかる。

[0053]

[表10]

冷凍耐性製パン試験の配合処方

生地配合 (小麦粉2kg使用)	小麦粉(日清製粉「カメリヤ」[1])	100部
	上白糖	25部
	食塩	0.5部
	パン酵母(65%湿菌体)	8部
	生地改良剤(カネカ製 KDIMEF4)[2]	0.6部
	油脂(カネカ製「スノーライト」[1])	10部
	脱脂粉乳	3部
	全卵	10部
	水	52部
工程	ミキシング(カントー 20 コートミキサー[3])	低速2分/中速5分/高速1分 油脂投入 低速2分/中速5分/高速1分
	生地捏上温度	20±0.5℃
	フロア発酵	27℃、45分
	生地分割	70g
	ベンチタイム	15分
	成型	ロール型
	冷凍	−30℃ 1時間 −20℃ 3ヶ月保存
	解凍	25℃ 60分
	ホイロ発酵	温度39℃/湿度86% 60分
	焼成	180℃、12分

1)登録商標

2)「カネカドウインプルーバーEF4」

2)関東混合機工業株式会社製、「HPi−20M」

[0054]

[表11]

冷凍耐性製パン試験の評価結果
(5℃ 6週間保存菌株使用)

	使用パン酵母	比容積 1週間冷凍	比容積 3ヶ月冷凍
比較例4	SG	7.44	6.25
比較例5	GA	7.77	6.07
比較例6	US	7.17	5.52
実施例4	KCY1217	8.55	7.11
実施例5	KCY1222	8.63	7.05
実施例6	KCY1229	8.71	7.21

請求の範囲

[請求項1] サッカロミセス・セレビシエに属するパン酵母を生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、表１の配合で、無糖及び高糖のパン生地を作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上、かつ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上、更には表２の配合で高糖のパン生地を作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した高糖生地Ｂを、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であることを指標に選択して得られるサッカロミセス・セレビシエに属するパン酵母。

[表1]

生地発酵力測定の配合と工程

		無糖生地	高糖生地A
配合	小麦粉	100g	100g
	上白糖	0g	40g
	食塩	1．5g	0．5g
	パン酵母(65%湿菌体)	4g	4g
	水	65mL	47mL
条件	ミキシング	3分	3分
	分割量	20g	20g
	ガス発生量測定	38℃ 2時間	38℃ 2時間

[表2]

高糖生地冷凍耐性測定の配合と工程

		高糖生地B
配合	小麦粉	100g
	上白糖	25g
	食塩	0．5g
	パン酵母(65%湿菌体)	6g
	水	54mL
条件	ミキシング	3分
	分割量	20g
	前発酵	30℃で、90分間
	冷凍	−20℃で、2週間
	解凍	25℃で、30分間
	ガス発生量測定	38℃で、2時間

［請求項2］ 請求項１に記載の選択に用いるパン酵母が、

サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表１の配合で高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が５７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株とを交雑して第一世代交雑株を作製し、

前記第一世代交雑株を生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上かつ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となることを指標に菌株を選抜した後、該菌株を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜して一次スクリーニングを実施し、第一世代交雑株から複数株を選択し、

前記選択された複数の第一世代交雑株を胞子形成させて交雑して得られる第二世代交雑株である請求項１に記載のパン酵母。

［請求項3］ サッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２１７（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５８）又はサッカロミセス・セレビシエ　ＫＣＹ１２２２（ＮＩＴＥ　ＢＰ－１０５９）である請求項１又は２に記載のパン酵母。

［請求項4］ 請求項１～３のいずれかに記載のパン酵母を有する生地。

［請求項5］ 請求項４に記載の生地を焼成して得られるパン。

［請求項6］ 請求項１～３のいずれかに記載のパン酵母の製造方法であって、以

下の（１）～（５）の工程を含むことを特徴とするパン酵母の製造方法。

（１）サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表１の配合で高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する発酵力が５７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、

サッカロミセス・セレビジエに属する長期冷蔵保存前の生イースト状態のパン酵母を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４７ｍＬ以上であることを指標に選択して得られる菌株から作製した胞子株と、を交雑して第一世代交雑株を作製する工程

（２）前記第一世代交雑株を生イースト状態のまま３０℃の雰囲気下で２４時間放置し、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で２時間測定する生地発酵力が無糖生地で４５ｍＬ以上かつ高糖生地Ａで４５ｍＬ以上となることを指標に菌株を選抜した後、該菌株を用いて前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵した後冷凍し、２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する生地発酵力が１５５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜して一次スクリーニングを実施し、第一世代交雑株から複数株を選択する工程

（３）前記工程で選択された複数の第一世代交雑株を胞子形成させ、交雑して第二世代交雑株を作製する工程

（４）前記第二世代交雑株を生イースト状態で６週間冷蔵保存した後、前記表１の配合で無糖生地及び高糖生地Ａを作製し、３８℃で二時間測定する発酵力が、無糖生地で４０ｍＬ以上、かつ高糖生地Ａで４０ｍＬ以上、さらには前記表２の配合で高糖生地Ｂを作製し、３０℃で９０分間前発酵したあと２週間冷凍保存した生地を、２５℃で３０

分間解凍処理した後、３８℃で２時間測定する発酵力が１４５ｍＬ以上であることを指標に菌株を選抜する二次スクリーニングを実施する工程

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/056751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/18(2006.01)i, *A21D8/04*(2006.01)i, *C12R1/865*(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N1/18, A21D8/04, C12R1/865

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2004-298014 A (Japan Tobacco Inc.), 28 October 2004 (28.10.2004), entire text (Family: none)	1-2,4-6 3
Y A	JP 7-79767 A (Kaneka Corp.), 28 March 1995 (28.03.1995), entire text (Family: none)	1-2,4-6 3
Y A	WO 95/21533 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 17 August 1995 (17.08.1995), entire text & US 5997914 A & EP 744127 A1 & AU 1591195 A	1-2,4-6 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 May, 2012 (24.05.12)	05 June, 2012 (05.06.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2012/056751

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2006-238803 A (Kaneka Corp.), 14 September 2006 (14.09.2006), entire text (Family: none)	1-2,4-6 3
Y A	JP 2004-49217 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 February 2004 (19.02.2004), entire text & US 2003/0161911 A1 & EP 1338647 A2 & CN 1439712 A & AU 2003200589 A	1-2,4-6 3
Y A	JP 2004-41189 A (Kaneka Corp.), 12 February 2004 (12.02.2004), entire text (Family: none)	1-2,4-6 3

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１２／０５６７５１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/18(2006.01)i, A21D8/04(2006.01)i, C12R1/865(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/18, A21D8/04, C12R1/865

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	JP 2004-298014 A (日本たばこ産業株式会社) 2004.10.28, 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-6 3
Y A	JP 7-79767 A (鐘淵化学工業株式会社) 1995.03.28, 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-6 3
Y A	WO 95/21533 A1 (協和醗酵工業株式会社) 1995.08.17, 全文 & US 5997914 A & EP 744127 A1 & AU 1591195 A	1-2, 4-6 3

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２４．０５．２０１２	０５．０６．２０１２

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４６７１
幸田　俊希
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	JP 2006-238803 A (株式会社カネカ) 2006.09.14, 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-6 3
Y A	JP 2004-49217 A (協和醗酵工業株式会社) 2004.02.19, 全文 & US 2003/0161911 A1 & EP 1338647 A2 & CN 1439712 A & AU 2003200589 A	1-2, 4-6 3
Y A	JP 2004-41189 A (鐘淵化学工業株式会社) 2004.02.12, 全文 (ファミリーなし)	1-2, 4-6 3