

製パン用発酵種に関する基礎的研究

藤本, 章人

<https://hdl.handle.net/2324/2236295>

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

製パン用発酵種に関する基礎的研究

藤 本 章 人

2019

製パン用発酵種に関する基礎的研究

目次

第1章 緒論	1
第2章 日本のベーカリーで使用される発酵種の菌叢評価と成分分析	14
第1節 諸言	14
第2節 実験方法	15
第1項 原料の入手、保管方法と各店舗の条件	15
第2項 乳酸菌数および酵母菌数測定	16
第3項 菌種の同定方法	17
第4項 pH測定と有機酸分析	19
第5項 糖分析	19
第6項 遊離アミノ酸分析	20
第7項 マイクロ固相抽出法(SPME)を用いた香気成分分析	21
第8項 発酵種を使用した製パン方法	22
第9項 官能評価方法	22
第3節 実験結果	23
第1項 発酵種に存在する乳酸菌種と酵母菌種について	23
第2項 発酵種の食品成分(pH、有機酸、糖、遊離アミノ酸)について	24
第3項 発酵種の香気成分の特徴について	25
第4項 各ベーカリーの発酵種を使用したバケットの評価について	25
第4節 考察	26
第5節 小括	30
第3章 伝統的な発酵種の形成過程における食品成分の変化と微生物の挙動	40

第1節 諸言	40
第2節 実験方法	42
第1項 使用原料	42
第2項 ビスコグラフによるライ麦粉と小麦粉の酵素活性評価	42
第3項 発酵種の調製方法	43
第4項 pH測定	43
第5項 遊離アミノ酸分析	43
第6項 有機酸分析	44
第7項 糖分析	44
第8項 使用した培地と生菌数測定	45
第9項 マイクロ固相抽出法(SPME)を用いた香気成分分析	46
第3節 実験結果	47
第1項 ビスコグラフを利用したライ麦粉および小麦粉の酵素活性について	47
第2項 発酵種の発酵過程におけるpH、有機酸、糖の成分変化	48
第3項 発酵種の発酵過程における遊離アミノ酸の成分変化	49
第4項 グラム陰性菌、乳酸菌、酵母の生菌数の変化	49
第5項 発酵種中の香りの違いについて	50
第4節 考察	50
第5節 小括	55
第4章 伝統的な発酵種工程の菌叢に与える原料の影響について	69
第1節 諸言	69
第2節 実験方法	69
第1項 使用原料	69
第2項 発酵種の調製方法	70

第3項	pH測定	70
第4項	使用した培地と菌数測定	71
第5項	菌種の同定方法	71
第3節	実験結果	73
第1項	各年の発酵種から分離したグラム陰性菌、乳酸菌、酵母の菌数	73
第2項	各発酵種から分離した微生物の菌種同定	74
第4節	考察	75
第5節	小括	78
第5章	総括	83
	参考文献	88

第1章 緒論

パンの歴史は古く、小麦が栽培され始めるメソポタミア文明にまでさかのぼる。河川流域で小麦が栽培されるようになるとそれを原材料として水と捏ねて焼成しただけのいわゆる無発酵パンが食べられるようになった(越後、1976年)。その後、約4400年前のエジプト文明の時代には、酵母による発酵をともなういわゆる発酵パンが発明され、その後、200種以上のパンに発展したといわれている(越後、1976年)。また、エジプト古王国時代のビール製造工程図にはパンとビールの製造が密接な関係であったことが示されている。その工程図にはサワードゥやパン焼き、また酵母の種おこしの様子が描かれており、当時のビール製造は半焼成パンの中にいる生きた酵母を利用して作られ、半焼成のパンをさらに焼成したものがパンとして食されていたとされている(日清製粉株式会社ら、1985年)。ちなみに「サワードゥ (Sourdough)」とは、パンを膨らませるために使用された原材料のひとつであり、小麦粉やライ麦粉などを自然発酵させた多くの乳酸菌や酵母が存在するペースト状から生地状の発酵物であり、その味が酸っぱいことから、「サワー+ドゥ=酸っぱい+生地」と呼ばれるようになった。サワードゥは乳酸菌や酵母を含む発酵物のため、「サワー種」とも言い換えられるが、最近では日本パン技術研究所の推奨で正式には「発酵種」と呼ばれて利用されている(井上、2007年)。

この発酵種の歴史は発酵パンの歴史とも重なっている。エジプト文明で発展した発酵パンはその後、ギリシャを経由し、イタリア、フランスなどヨーロッパの各地に広がっていったとされている。その過程で「パンの商業化」、「パン業者の組織化」、「純度の高いパン種の管理」へと文化や技術が発展していったといわれている(日清製粉株式会社ら、1985年)。現在、イタリアのナポリ近

くにあるポンペイ遺跡にはベーカリーでパンが作られていたことを描いたフレスコ画や挽き臼、焼き釜などの設備、炭になったパンなどが今でも残っている。

前述した「発酵種」中でも世界的に知名度の高いものとしては、「ホップス種（イギリス）」、「ルヴァン種（フランス）」、「パネトーネ種（イタリア）」、「サンフランシスコサワー種（アメリカ）」、「ライサワー種（ドイツ）」がある。ホップス種はホップの受粉前の花からとった酵母にジャガイモなどのでん粉質を加えることにより作られ、いわゆる山形食パンに用いられることが多い（志賀、2007年）。ルヴァン種はフランスの厳格な法律に基づき、ライ麦粉、小麦粉を種継ぐことで乳酸菌と酵母を生育させて作られ、バケットなどに用いられる（志賀、2007年）。また、パネトーネ種はイタリア北部のコモ湖周辺の伝統的な発酵種であり、生まれたての子牛が初乳を飲んだ後の腸内物質から取り出した乳酸菌を小麦粉と混合して作られ、クリスマス時期にパネトーネとして食される（Gänzle ら、1998年；Vogel ら、1999年）。サンフランシスコサワー種はアメリカのサンフランシスコ湾岸地方特有の酵母をジャガイモの煮汁で培養した発酵種であり、パンに芳醇な香りを付与する（Kline と Sugihara 1971年；Sugihara ら、1971年）。ドイツを中心に発展したライサワー種はライ麦粉に水を入れて捏ねる際に、ライ麦粉由来や自然に入る大気（環境）由来の酵母や乳酸菌を利用して発酵させた発酵種である。グリアジンが主体のライ麦粉は小麦粉と違い、グルテンを作りにくいいため、生地を酸性化させ、焼成時にゲル化させることでライ麦パンができる（志賀、2007年）。

それぞれの国で使用される原材料や製法はいずれも異なっているものの、これら発酵種は乳酸菌と酵母で構成され、パンを膨らませる上で重要な役割を果たしてきた。それと共に副次的な役割で風味づけや保存性向上、生地酸性化によるゲル化促進の機能も担い、各地でその土地に合わせたパンが発展していっ

たといわれている。

しかし、1600年以降にオランダのレーウエンフックが顕微鏡を発明し、微生物の観察ができるようになり、1857年にフランスのパスツールが酵母の発酵原理を解明した後、パン種の役割は徐々に工業的に製造されたパン酵母に置き換えられてしまうことになる。1909年よりパン酵母製造法の基礎が完成し、パン酵母の工業化が進んだ。発酵種は乳酸菌と酵母が共存するため、パンの膨らみを安定させるためには、管理に多大な労力や経験が必要となるが、パン酵母はパン生地の膨らみに特化した菌株を自然界から分離して、糖蜜を使用して酵母を純粋培養させたものであるため、比較的安定してパンを膨らませることができ、大規模ベーカリーの発展に大きく貢献し、利用が拡大していった。そして、現在ではほとんどのパンにパン酵母が使用されており、パンを膨らませるために欠かせない原材料の一つとなっている。

日本にパンが伝わったのは室町時代の鉄砲伝来の時といわれ、宣教師によって一部で広められたといわれている（越後、1976年）。その後、江戸時代に入ると鎖国の影響でパンづくりの伝承は衰退するもの、江戸時代末期には再び外国人居留地で広まり、長崎、横浜、神戸でベーカリーが誕生する。この時にはホップの煮汁を使った発酵種であるホップス種が使われていたといわれている（日清製粉株式会社ら、1985年）。明治時代に入ると日本人によるベーカリーが誕生するが、日本国内でホップが入手できなかったため、日本酒の酒母のような酒種を使って、日本人好みのあんぱん（銀座木村屋）が誕生した（越後、1976年）。ここで出てくる「酒種」は麴と酵母の発酵によってつくられるが、パンを膨らませる以外にも、フルーティーな吟醸香が付与されることもあり（河合、1996年）、日本発の発酵種として認められている。昭和に入ると大量生産式の製パン工場が誕生し、パンは学校給食にも採用され始めるようになり、

現代にいたるまで様々な発展を遂げている。平成 23 年の総務省統計局による家計調査（二人以上の世帯）結果では、昭和 55 年と平成 22 年での食料費の内訳を示しているが、米からパンへシフトしていることを示しており（総務省統計局、2011 年）、平成 24 年には二人以上の世帯において、1 年あたりのパンの支出額は米の支出額より多くなっており、その状況が続いている（総務省統計局、2018 年）。

2016 年の日本国内のパン市場については、約 2 兆 7 千億円を超える市場が形成されており、微増傾向となっている。（富士経済東京マーケティング本部、2017 年）特にパン製造においては量販店で袋売りを中心とし食パン、菓子パン、惣菜パンなどを製造する製パンメーカーと小規模店舗でパンを製造し、店頭販売するリテールベーカリーがある。製パンメーカーで製造されたパンは、機械化が進んでおり、効率よく大量のパン製品を製造するが、おいしさは言うまでもなく、その品質安定性、衛生管理やホールセールでの棚もちが重視される。一方、リテールベーカリーでは手作業による製パン作業が中心であるが、こだわりの素材や手間暇かけた製法、焼き立ての提供などが重視されやすい。

最近では、リテールベーカリーで代表的な製法の一つである低温長時間熟成法に着目し、その成分やおいしさの特長を解析した上で、パン生地に加えるだけで、その特徴が手軽に付与できるようなパン資材製品が開発されている（川戸、2012 年）。

そのようなパン業界の近年の流れとして、小麦粉やマーガリンといった原材料の値上げに伴い、大手小売りを中心とした低価格帯ブランドの台頭や高齢化社会に対応し、パンのサイズや枚数を少なくした個食化が進みつつある。また、パンの付加価値提供や品質の向上を狙って発酵種や国産小麦の利用などの様々な動きも見られているほか、健康志向の流れの中で全粒粉や食物繊維の利用や

乳化剤、着色料不使用にこだわったパンなどが広がり始めている。さらにコンビニエンスストアやカフェ業態の店舗増加とパン技術者の減少に伴い、セントラルベーカリーでパン生地を製造し、急速冷凍後に冷凍保管し、適切な受注タイミングで焼成したり、冷凍輸送後に店舗のオーブンで焼成したりする冷凍生地製法などが普及しつつある（矢野経済研究所編集部、2013年）。その一方では2011年の東日本大震災を機に、糖分や油脂を多く含ませることで水分活性を低く設定し、アルコール製剤などを併用することで、賞味期限を長く設定したいわゆるロングライフパンなども需要が高まっている。ただし、健康志向に合わせて配合を大きく変えた場合にはパンの風味や食感が劣化しやすくなるほか、冷凍生地製法を用いた場合には、パンのボリューム不足や発酵風味の揮散、食感の劣化、ロングライフを目指す場合には、長期間に渡る風味や食感の保持において、品質面に課題が出てしまう。その解決方法の一つとして、発酵種や発酵風味料といった乳酸菌発酵させた発酵製品を利用した解決が図られている。

（藤本、2012年）

一般的な製パン工程はミキシング、一次発酵、分割、丸め、成型、二次発酵、焼成という過程を取る。直捏法は原料を一度にすべて混捏するという点でシンプルな製法とされているが、気を付けなければならないポイントは多くあり、特に「原材料（小麦粉、水など）の温度」、「ミキシング時のパン生地温度とグルテンの出来具合」、「発酵時の温度と生地の膨らみ具合」がチェックポイントとして挙げられる。ミキシングから焼成までの作業時間はおよそ3-4時間であるが、ミキシング時や発酵中の温度や作業は1分単位で制御される。時間管理が重要であるという一つの例だが、環境温度にデリケートなパン酵母は温度によっても膨らみ方が変わるため、手早い作業でなければ、作業中のパン生地の温度が刻一刻と変わるため、一つの生地から多くのパンを作るときに、最初のパ

ンと最後のパンで大きさが変わってしまうケースも発生する。さらに季節により水温や原材料などの温度は毎日微妙に変わるため、その点も考慮する必要がある。パン製造のすべての工程はパン酵母による発酵を常に考えながら進められていく、温度や時間にとってもデリケートな工程である。パン製造技術者はこれらの要点を熟知した上で、おいしく安定した品質のパンを製造していく必要があるため、育成に非常に時間がかかり、結果として技術者不足につながってしまっている背景がある。また、日本政府が推奨する働き方改革の一環として、労働時間の短縮が求められており、如何に短い時間でおいしいパンを提供できるかなども課題として挙げられている。これまでの解決策としては、発酵に由来する「おいしさ」を犠牲にして発酵時間を短縮したり、ドウコンディショナーという温度と湿度を管理する機械を利用して、勤務時間外に一晩かけて発酵させたりするような工夫が取られているが、いずれも「おいしさ」と生産性がトレードオフの関係になっている。

現在のパン業界ではパン生地を膨らませるという点で安定した品質をもつパン酵母が主流であり、製パン工程のミキシング時に添加され、利用されている。一方で、純粹培養されたパン酵母を利用した場合には、パンの香りが単調になることが多い。また、上述したように発酵時間を短縮しなくてはならない状況になった場合には、発酵由来の風味が大幅に不足してしまうため、製パン作業前に調製された発酵種が用いられている。Fig.1にはルヴァン種と呼ばれる発酵種と製パンの作製工程について示した。発酵種はライ麦粉、小麦粉、モルトエキスを混捏し、所定の発酵条件で自然発酵させた後、翌日以降は前日の発酵種に小麦粉と水を加えて、さらに所定の条件で自然発酵して作られる。乳酸菌や酵母によってフルーティーで芳醇な香りが感じられるようになった発酵種はその一部を製パン工程に移し、残りはさらに種継ぎに用いられる。発酵種の種継

ぎは基本的に毎日行われるが、発酵種は乳酸菌や酵母による発酵により有機酸、遊離アミノ酸、香気成分などの成分変化が起こるとされている。発酵種は過去にパンを膨らませる目的で使用されてきたが、近年では10-20%程度の発酵種とパン酵母を一緒にミキシングし、品質の良いパンが作られるケースが増えている。おいしさのメカニズムについてその詳細はすべて明らかになっていないものの、発酵種を添加するメリットは、乳酸菌と酵母に由来する発酵生成物がパンに複雑な発酵風味を付与することに加え、パン生地の伸展性が向上することでパンの食感が改良され、これらの結果としてパンの完成度や嗜好性が上がることにある。

ここで取り上げている発酵種は日本国内の消費者にとっては、「天然酵母」と呼ばれることが多く、その対照としては、純粋培養されたパン酵母（いわゆるイースト）がある。しかし、パン酵母も製パン適性が高いパン酵母を自然界から分離し、場合によっては優良菌株を選抜するために人為的に酵母菌株の育種（掛け合わせ）によって改良は行われるものの、天然の糖蜜を使って純粋培養して作られるものである。欧州のイースト製造業者では諸外国で販売するドライイースト（製パン用乾燥酵母）の表示に英語では **Natural Yeast**、フランス語で **Levure naturelle**、中国語では天然酵母と表示しており、パン酵母もいわゆる「天然酵母」であることから、パン酵母と「天然酵母」という対照的な呼称は不適切であると考えられている（井上、2007年）。

また、発酵種もパン酵母も本来はいわゆるパン生地の発酵を促すために加えるものである。パン酵母はよりパン生地を膨らませるために、純粋培養後に発酵に使用した糖蜜の水洗工程があるが、発酵種は複雑な微生物叢をもつため、生地膨張力がないものの、発酵時の発酵生成物や発酵に用いた素材の残渣がパンのおいしさに寄与しているため、同じパン種ではあるが区別する必要がある、

イースト工業会ではパン酵母と発酵種という呼称をそれぞれ使い分けることを推奨している（井上、2007年）。なお、世界的にも発酵種には乳酸菌と酵母が存在しているが、いずれも、乳酸菌活性が高い発酵種が多く、発酵種の多くはサワー種と総称されている。

発酵種は上述のように乳酸菌や酵母を含む発酵物でその歴史は長いが、発酵種を構成している微生物については、今もなおヨーロッパを中心に世界各国で分離、同定、評価が行われている（De Vuyst ら、2014年；Infantes と Tourneur、1991年；Lhomme ら、2015年；Ripari ら、2016年；Scheirlinck ら、2007年）。パン種の原料や製法は地域や店舗によってさまざまな違いがあるため、そこに付着する微生物もそれぞれ異なるが、最も代表的な乳酸菌種としては *Lactobacillus sanfranciscensis* が挙げられる。Kitaraha らは5つのサワー種から21菌株の *Lactobacillus sanfranciscensis* を分離し、4つのタイプがあることを明らかにしており、*Lactobacillus sanfranciscensis* の菌種が非常に多様性に富んでいることを示唆している（Kitahara ら、2005年）。その他にも *Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus brevis* など50種類以上の多くの菌種について分離・同定された報告がある（De Vuyst と Neysens、2005年）。また、酵母菌種としては *Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces exiguus*、*Candida humilis* など20種類以上の分離事例が報告されている（De Vuyst と Neysens、2005年）。通常、発酵種の乳酸菌と酵母の比率は100:1の割合で共生して存在することが多いとされているが、*Lactobacillus sanfranciscensis* の場合は発酵種中に存在するマルトースを資化し、グルコースを細胞外に排出することが知られており、*Saccharomyces exiguus* といったマルトースを資化できない酵母とうまく共生していると報告されている（Stolz ら、1993年）。

日本国内において発酵種を作るには、りんごや柑橘類といった果実やレーズ

ンのようなドライフルーツ、小麦粉やライ麦粉などといった穀物を主原料として、自然発酵させて作ることが多い。りんごやレーズンなどを用いるときには一定量のショ糖と水を加え、冷蔵庫で保管し、数日そのままの状態で待つと、原料に付着している酵母が増殖し、気泡が発生する。酵母が十分に増殖した上記の液体に小麦粉を混ぜ、さらに発酵させたものを「りんご種」、「レーズン種」と呼んで利用することが多い（旭屋出版編集部編、2002年；志賀、2007年）。一方で、ライ麦粉や小麦粉、水、モルトを主原料として、中温域（25–28℃）で約6日間種継ぎと発酵を繰り返して完成する、いわゆるフランス発祥の「ルヴァン種」があり、1つの製法としてリテイルベーカリーを中心に広く普及している（藤本、2012年）。

パンにおいて乳酸菌が関わっていることはあまり知られていないが、上述したように発酵種の中には酵母以外にも乳酸菌が含まれており、乳酸菌はパンの品質に大きく影響するとされている。乳酸菌の発酵により生成される成分、特にフレーバー成分、有機酸類、菌体外多糖などはパンの品質と大きく関係している。フレーバー成分では、甘い香りやサワー香、フルーティーな香りを付与する効果が認められているが、代表的な成分としては、ジアセチル（バター様の香り）、エタノール（甘い香り）、酢酸エチル（エステル香）がある（HansenとSchieberle、2005年）。また、アミノ酸の一種であるオルニチンのように焼成後に香ばしい香りを付与する成分（Yoshihashiら、2002年）なども報告されている。乳酸菌から生成される有機酸類は乳酸、酢酸が中心になるが、これらの成分がパンに含まれるといずれもpHが低くなる。そのため、パン生地中のグルテンの軟化により生地の伸展性の向上、パンのしっとりさなど、食感品質の向上（藤本と須藤、2010年）、パンの発カビ遅延（Gänzle、2014年）効果があるとされている。また、乳酸、酢酸の影響でわずかに酸味を感じやすくなるが、含ま

れる量によっては酸味と認識されず、味が濃く感じられることもある。さらにこれらの成分はパンの香りを全体的にすっきりさせる効果があるため、雑穀パンであれば、嫌な臭いのマスキングや、副原料のよい香りの強調効果がある。

菌体外多糖については乳酸菌の中でも主に *Leuconostoc mesenteroides* や *Weissella* 属で作られることが多い (Lacaze ら、2007 年)。これらの乳酸菌はショ糖からブドウ糖のポリマーであるデキストランという高分子の多糖を作ることが知られている。その多糖をパンに添加した場合、生地の保水力が上がるため、パンの柔らかさやしっとりさを保持しやすくなり、いわゆるパンの老化防止により効果が期待できると報告されている (Lacaze ら、2007 年)。

上記のように、これら乳酸菌はパンの香りや味、食感などに良い影響を与えていることが認められるようになってきた。最近の日本ではパン酵母の利用だけにとどまらず、乳酸菌で発酵させた原材料を「発酵種」、「発酵風味料」といった原材料名称で呼び、広く使われるようになってきている(藤本、2012 年)。また、海外においてはセアリック病患者向けに小麦粉を使用しない「グルテンフリー」のパンなどが普及しつつあるが、小麦粉の代替として米や粟、稗などの穀物粉が用いられるケースが増えている。米や雑穀の独特な風味のマスキング、焼成後の水分蒸発が多くパサつきやすい食感を改善するなどの目的で、乳酸菌発酵物の利用が見直されつつある (Rühmkorf ら、2012 年)。これら乳酸菌の発酵による効果は、一般に流通されている香料や品質改良剤、乳化剤などと比べるとその香りや食感改良などは際立って実感できるものではなく、10 人が試食したら、7-8 人が良いと感じるレベルの効果であることが多い (藤本と須藤、2010 年)。乳酸菌の発酵物でパンを改良する良さは香り、味、食感改良など複数の機能が穏やかに働き、パンの品質を引き上げる点であり、そこが消費者にとって、自然なおいしさを味わえるポイントになっている。

日本においては欧米に比べてパンや発酵種の歴史は浅いものの (Fujimoto ら、2018 年)、欧米の発酵種をモデルにした製法が急速に普及し、広くベーカリーで利用されつつある (Fujimoto ら、2018 年)。ただし、日本国内のベーカリー店舗で使用されている乳酸菌や酵母の菌種同定や発酵種の食品成分に関する知見は極めて少なく、欧州からの情報や日々の経験に基づいて、発酵種の管理が行われている。

そこで本研究では、まず、日本の関西地区のベーカリー4店舗で長年、種継がれ、使用されている発酵種を入手し、それら発酵種に含まれる乳酸菌や酵母の菌数や菌種同定を行った。また、乳酸菌や酵母の発酵過程においては、有機酸、糖、遊離アミノ酸、香气成分といった食品成分が変化するため、その特徴についても評価を行った。また、各店舗で製造されている発酵種をバケットに添加した時の特徴を官能評価し、各店舗の発酵種がパンの品質に与える影響について検討を行った。その結果、ベーカリーで作られている発酵種の菌叢は酵母菌種に比べて乳酸菌種の種類が多く、各店舗の発酵種はバケットの焼成香の強さや香ばしい香りの質に影響を与えていることが明らかとなった。

一方、日本のベーカリーでよく用いられる6日間かけて自然発酵させる発酵種の製法では、原料に使用されるライ麦粉や小麦粉の銘柄やロットが作り手によって異なる。また、欧州を中心に伝統的な発酵種の乳酸菌や酵母の存在については数多く報告されており (De Vuyst ら、2014 年 ; De Vuyst と Neysens、2005 年 ; Lhomme ら、2015 年 ; Vogelman ら、2011 年 ; Weckx ら、2010 年-a ; Weckx ら、2010 年-b ; Weckx ら、2011 年) 、いくつかの研究ではフランスやイタリアの発酵種工程中の微生物挙動の調査結果が報告されている (Ercolini ら、2013 年 ; Ferchichi ら、2007 年 ; Onno と Roussel、1994 年) が、フランスやイタリアで行われている発酵条件と日本で多く利用されている発酵条件は異なっており、

日本国内のベーカリーで行われている発酵種の製法に 6 日間かかる理由やその工程における微生物挙動、発酵の安定性について詳細な報告は少ない。そこで本研究では日本でもっとも頻繁に用いられている伝統的な発酵種の作製工程に着目し、製粉拠点の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して、それぞれ 2 種類の発酵種を作製して食品成分の変化と微生物挙動について比較検討を行った。食品成分については、発酵種の作製工程における有機酸、糖、遊離アミノ酸の変化と最終的に完成した発酵種の香気成分を評価した。その結果、微生物挙動については使用した原料の種類に関わらず、発酵 1 日目には CVT 培地でグラム陰性菌が生育し、発酵 2 日目には MRS 変法培地で検出される乳酸菌が優勢なることが確認された。また、酵母については原料の種類によって、発酵種工程中の生育挙動が明らかに異なっていた。特に日本で製粉された穀物粉を用いた発酵種は、発酵 3 日目以降から YPD 変法培地で酵母が検出され、フランスで製粉された穀物粉と比べても、発酵種中にエステル類やアルコール類といった香気成分を多く含むため、発酵種の品質として好ましいものであった。

次に日本で製粉された同じ原料を使用して調製した発酵種について、ライ麦粉と小麦粉の製造ロットを変えた際の菌叢の変化について調べた。その結果、発酵 1 日目で *Pantoea* 属、*Erwinia* 属等の腸内細菌科細菌が増殖し、次いで *Pediococcus* 属、*Lactobacillus* 属の乳酸菌が優勢になり、発酵 3 日目以降に *Saccharomyces* 属、*Pichia* 属、*Candida* 属など多様な酵母菌種が高い頻度で検出された。また、同じ原材料を用いた場合でも、穀物粉の製造ロットが異なることで、発酵種の菌叢が変化し、品質リスクが高まることが示唆された。一方、発酵種において代表的な乳酸菌であり、日本国内のベーカリーでも検出された *Lactobacillus sanfranciscensis* は検出されなかった。

Manufacturing process of the sourdough

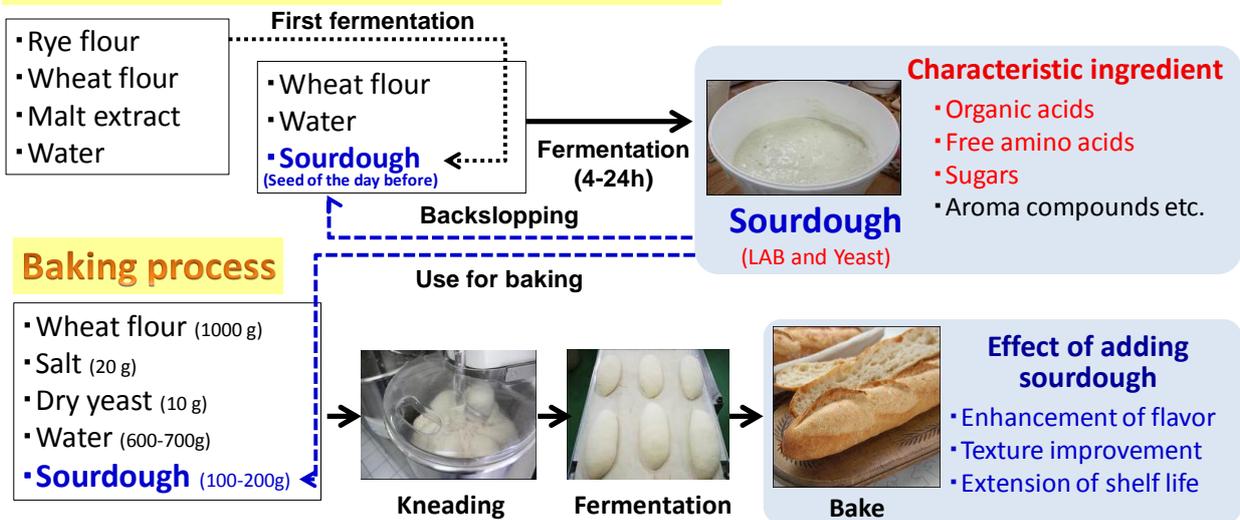


Fig. 1. How to use sourdough in Japanese bakeries

Sourdough has been used to improve bread qualities such as aroma, taste, texture and shelf life. The composition of organic acids, amino acids and sugars in sourdough is important as it relates to the quality of bread. On the other hand, the kinds of lactobacilli and yeast are also important, because the compositions of ingredients in sourdough are influenced by the kinds of lactobacilli and yeast.

第2章 日本のベーカリーで使用される発酵種の菌叢評価と成分分析

第1節 諸言

発酵種はパンの原料として用いられる乳酸菌と酵母からなる発酵物である (Corsetti ら、2007年 ; De Vuyst ら、2009年 ; De Vuyst ら、2014年 ; Minervini ら、2014年 ; Vogelmann と Hertel、2011年)。発酵種の中でも伝統的な発酵種の製法としてフランス由来のルヴァン種 (Fujimoto ら、2018年) が知られている。ルヴァン種はベーカリーにおいて、ライ麦や小麦などの穀物粉と水を混捏し、自然発酵を行うことで作られ、パンの原料として用いた後の一部の元種に新しい小麦粉と水を加え、繰り返し発酵しながら製造される (Fujimoto ら、2018年)。これら発酵種についてはこれまでパンの風味の改善 (Hansen と Schieberle、2005年)、食感の改良 (Arendt ら、2007年)、カビなどの生育を抑える効果 (Chavan と Chavan、2011年 ; Gänzle、2014年 ; Gobbetti ら、2014年) などが報告されているが、近年ではライ麦や小麦以外の穀物粉を使って調製された発酵種を用いることで、小麦グルテンを摂取できないセアリック病患者向けに作られるグルテンフリーパンの品質が改良できるという報告 (Rühmkorf ら、2012年) もある。このように発酵種の発酵についてはベーカリー商品の栄養的または機能的な品質に影響を与えるだけでなく、乳酸菌や酵母といった微生物代謝により、生地が酸性化し、酵素が活性化することやたん白質の分解が進むことも知られている (Gänzle ら、2008年 ; Gänzle ら、2014年)。特に発酵種の発酵過程で菌体外プロテアーゼやペプチダーゼが機能することで、発酵種中のペプチドやアミノ酸の濃度が増加することが知られており (Gänzle ら、2008年 ; Gänzle ら、2014年)、これはパンを焼成するタイミングでメイラード反応 (アミノカルボニル反

応)を介して、パンの香りに影響する化合物の生成に関与することが知られている (Pico ら、2015 年)。また、各地域で伝統的に種継がれている発酵種については、そこに含まれる乳酸菌や酵母の検出や同定が行われており (Corona ら、2016 年 ; Ercolini ら、2013 年 ; Harth ら、2016 年 ; Lhomme ら、2015 年 ; Ripari ら、2016 年)、欧米を中心に多様な乳酸菌種や酵母種が存在することが明らかになっている (De Vuyst ら、2016 年 ; Gobbetti ら、2016 年)。特に、乳酸菌については *Lactobacillus sanfranciscensis* をはじめ数多くの菌種について、発酵中の生育挙動や代謝なども報告されている (Minervini ら、2014 年 ; Stolz ら、1993 年)。

一方、日本においては欧米に比べてパン製造や発酵種利用の歴史は浅いものの (Fujimoto ら、2018 年)、欧米の発酵種をモデルにした製法が近年急速に普及し、広く日本のベーカリーで利用されつつある (Fujimoto ら、2018 年)。ただし、日本国内のベーカリー店舗で使用されている乳酸菌や酵母の菌種や発酵種の食品成分に関する知見は極めて少ない。そこで本研究では、関西地区のベーカリー4店舗で種継がれ、使用されている発酵種を入手し、乳酸菌、酵母の菌種同定を行うと共に、有機酸、糖、遊離アミノ酸、香気成分といった食品成分の特徴について評価を行った。次に発酵種をバケットに添加した時の官能的特徴を評価し、各店舗の発酵種がパンの品質に与える影響について考察を行った。

第2節 実験方法

第1項 原料の入手、保管方法と各店舗の条件

関西地区の4店舗のベーカリーより受領した発酵種サンプルを2つの無菌袋に約500gずつ入れ、それぞれ冷蔵(4℃)と冷凍(-20℃)で保管した。冷蔵保管したサンプルは24時間以内に乳酸菌数と酵母菌数測定に使用した。冷凍保

管したサンプルは2日以上冷凍保管したものを、流水で解凍後、速やかに成分分析や製パン評価に使用した。本研究で解析に供した4店舗の発酵種の種継ぎ条件や発酵条件をTable 1に示す。

ベーカリーAはルヴァンリキッド装置（ルヴァン30、株式会社愛工舎製作所、Saitama、Japan）を用い、25 °Cで4時間発酵させた後、4 °Cで16時間静置して発酵種を調製していた。小麦粉と水、前日の元種の比率は100:100:100であり、液状の発酵種を約8年間にわたり種継ぎをしているサンプルを評価に用いた。ベーカリーBは蓋付きのプラスチックの容器と恒温機を使用して28 °Cで16時間の発酵により発酵種を調製していた。小麦粉と水、前日の元種の比率は100:110:100で約4年間種継ぎを行っていたサンプルを評価に用いた。ベーカリーCはステンレスボールに入れて、ラップで蓋をし、恒温機にて28 °Cで24時間発酵させて発酵種を調製していた。小麦粉と水、前日の元種の比率は100:100:100のものを使用し、約4年間にわたり種継ぎを実施してきたサンプルを入手し、評価した。ベーカリーDは蓋付きプラスチックの容器と恒温槽を使用して、27 °Cで16時間発酵させて発酵種を調製していた。小麦粉と水、前日の元種の比率は100:60:100であり、生地状で約9年間にわたり種継ぎをしているサンプルを入手し、評価に用いた。

第2項 乳酸菌数および酵母菌数測定

発酵種サンプル中に存在する乳酸菌と酵母の菌数測定と検出は各寒天培地を使用して行なった。特に乳酸菌の検出はMRS変法寒天培地（カゼインペプトン10g、肉エキス2g、酵母エキス7g、グルコース7g、マルトース7g、フルクトース7g、グルコン酸ナトリウム2g、Tween80 1g、K₂HPO₄ 2.5g、酢酸ナトリウム5g、クエン酸2アンモニウム5g、MgSO₄・7H₂O、200mg、MnSO₄・

nH₂O 50 mg、システイン塩酸塩 0.5 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH 5.4) を使用した (Kitahara ら、1957 年)。また、酵母の検出には YPD 変法寒天培地 (グルコース 10 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、麦芽エキス 3 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH 6.2) を使用した。また、MRS 変法寒天培地には、酵母や黴のコンタミネーションを抑える目的で終濃度 10 mg/L となるようにシクロヘキシミド (Cycloheximide) を添加し、YPD 変法寒天培地には、細菌のコンタミネーションを抑制する目的で 100 mg/L クロラムフェニコール (Chloramphenicol) を加えた。各寒天培地はあらかじめオートクレーブにて 121 °C、20 分間の滅菌を行った後、無菌的にシャーレに 30 mL 入れ、固化させた。次いで、すべての発酵種サンプル 50 g を無菌的に滅菌袋に移し、5 倍量の滅菌生理食塩水 (0.8 % NaCl) を加え、ストマッカー (Bagmixer 400、interscience、Saint Nom、France) にて 60 秒間ホモジナイズした。得られた発酵種サンプルはさらに滅菌生理食塩水で段階希釈を行った上で 100 µL を表面塗抹し、30 °C で 48 時間培養後、1 g 中に存在する生菌数の計測を行った。

第 3 項 菌種の同定方法

各培地の生菌数測定後の同一希釈の平板培地よりそれぞれ 50 菌株をランダムに釣菌し、コロニー形状および顕微鏡観察結果からグルーピングした上で、乳酸菌と酵母の菌種同定を行った。乳酸菌の同定については FAST MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial PCR Kit & Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific、CA、USA) を使用して、16S rDNA 部分配列を解析し、データベースにて相同性を検索して、帰属分類群を推定した。また真菌の同定は FAST MicroSEQ D2 LSU rDNA Fungal PCR Kit & Sequencing Kit を使用して、D2 LSU rDNA 部分配列の相同性を評価することで同定を行った。寒天培地から供試菌体を釣菌し、PrepMan Ultra

Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を 100 μL 入れた 1.5 mL マイクロ遠心チューブに懸濁した。その後、ヒートブロックを使用して 100 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱し、遠心分離 (8947 $\times g$ 、5 秒間) 後の上清を DNA 溶液とし、鋳型として PCR 反応に使用した。495 μL の nuclease-free-water を 1.5 mL マイクロチューブに分注し、5 μL の鋳型 DNA 溶液を加えて、希釈した。その後、15 μL FAST PCR Master Mix と希釈した DNA 溶液 15 μL を混合した後、サーマルサイクラー (Veriti 96 well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) にて PCR 反応を行った。

FAST MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial PCR Kit の反応条件は初期熱変性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 秒) 後に、変性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、0 秒)、アニーリング (64 $^{\circ}\text{C}$ 、15 秒) を各 30 サイクル繰り返し、ファイナル伸長 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分を行った後に 4 $^{\circ}\text{C}$ で保温した。FAST MicroSEQ D2 LSU rDNA Fungal PCR Kit の反応条件は初期熱変性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 秒) 後に、変性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、0 秒)、アニーリング (64 $^{\circ}\text{C}$ 、15 秒) を各 35 サイクル繰り返し、ファイナル伸長 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分を行った後 4 $^{\circ}\text{C}$ で保温した。PCR 産物の精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN、Hidlen、Germany) を使用して行った。13 μL Forward Sequence Mix と 13 μL Reverse Sequence Mix PCR にそれぞれ精製した反応液 7 μL を混合し、サーマルサイクラー (Veriti 96 well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) にてシーケンスの反応を行った。シーケンス反応の条件は初期熱変性 (96 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分) 後、変性 (96 $^{\circ}\text{C}$ 、10 秒)、アニーリング (50 $^{\circ}\text{C}$ 、5 秒)、伸長 (60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 分 15 秒) を各 25 サイクル繰り返し、ファイナルステップを 4 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。反応後、Dye Ex 2.0 Spin Kit (QIAGEN) を用いて、Big Dye terminator を除去し、伸長産物の精製を行った。精製された伸長産物はキャピラリー電気泳動装置 (ABI PRISM、3130xl Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific) に供試し、塩基配列を決定した。DNA 塩基配列決定には 3100/3130x 50cm Capillary Array と POP-6 (Thermo Fisher

Scientific) のポリマーを使用し、電気泳動を行い、3130xl Data Collection software (Thermo Fisher Scientific) を使用して配列を決定した。得られた配列は MicroSEQ ID Analysis Software Ver.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、菌種の相同性を解析し、相同性が 99 %以上の菌種を特定した。

第 4 項 pH 測定と有機酸分析

5 g の発酵種サンプルを秤量し、イオン交換水にて 5 倍希釈した懸濁液を作製し、pH メーター (Seven Easy pH meter、Mettler-Toledo, AG, Switzerland) にて pH を測定した。また、有機酸分析については発酵種サンプルをイオン交換水にて 5 倍希釈した懸濁液を、遠心分離 (8,947×g、5 分、20 °C) により得た上清 1 mL に、20 %スルホサリチル酸を 20 μL 加え、攪拌し、0.45 μm メンブランフィルター (DISMIC-13CP; Advantec、Tokyo、Japan) でろ過して得たる液を分析用サンプルとした。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; LC10A Series device、Shimadzu、Kyoto、Japan) を用いて、下記の条件にて分析を行った。

- ・カラム : Organic Acid Column (7.8 mm×300 mm、Waters、MA、USA)
- ・カラム温度 : 40 °C
- ・溶媒 : A 緩衝相 (*p* トルエンスルホン酸 9.51 g を蒸留水で 100 mL にメスアップしたもの)、B 移動相 (*p* トルエンスルホン酸 9.51 g、Bis-Tris 41.85 g、EDTA-2Na 0.29 g を蒸留水で 100 mL にメスアップしたもの)
- ・流速 : A、B とともに 0.8 mL/分
- ・検出器 : RI 検出器

第 5 項 糖分析

5 g の発酵種サンプルをビーカーに秤量し、5 倍量の 50 %アセトニトリル水

溶液を加え、ホモジナイズした。ホモジナイズした発酵種懸濁液は 50 mL の蓋付試験管に入れ、遠心分離（8947×g、5 分間）後の上清を 1 mL 分取した後、20 % スルホサリチル酸を 20 μL 加え、攪拌し、0.45 μm メンブランフィルター（DISMIC-13CP; Advantec）でろ過して得たろ液を分析サンプルとした。高速液体クロマトグラフィー（HPLC ; LC10A Series device、Shimadzu）を用いて、下記の条件にて糖分析を行った。

- ・使用カラム : Asahipak NH2P 50-4E （4.6 mm×250 mm、Showa Denko KK、Tokyo、Japan）

- ・カラム温度 : 40 °C

- ・溶媒 : 75 % アセトニトリル

- ・流速 : 1.0 mL/分

- ・検出器 : RI 検出器

分析には、グルコース、フルクトース、マルトース、ラクトース、スクロースの特級試薬（Kishida Chemical Co.、Tokyo、Japan）を超純水で希釈し、標準試薬として使用した。

第 6 項 遊離アミノ酸分析

発酵種サンプル 5 g を秤量し、2 % スルホサリチル酸溶液を加え、ホモジナイズ後、遠心分離（8947×g、5 分間）後の上清を分取した。一晩放置し、さらにタンパク質沈殿物を除いたものを 0.45 μm メンブランフィルター

（DISMIC-13CP; Advantec）でろ過し、試料として調製した。遊離アミノ酸の定量は全自動アミノ酸分析機（JCL-500/V、JEOL Co., Ltd.、Tokyo、Japan）で行なった。

第7項 マイクロ固相抽出法 (SPME) を用いた香気成分分析

香気成分の分析にはダイナミックヘッドスペース-マイクロ固相抽出法 (SPME; Solid Phase Micro Extraction) を用いた。調製した発酵種サンプル 1 g と食塩 1 g、内部標準として 0.1 %シクロヘキサノール溶液 100 μ L を 25 mL ガラスバイアル瓶に入れ、窒素ガスを充填し、密栓した。サンプルを 50 °C で 30 分間攪拌加温することで平衡化した後、SPME ファイバー (50/30 μ m Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxane、2 cm、SUPERCO、PA、USA) をバイアル中へ挿入し、さらに 50 °C で 30 分間攪拌加温する事でバイアル中のヘッドスペース中にある香気成分を SPME に吸着させ、捕集した。捕集した香気成分をガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー (GC-MS ; GC:7890A GC system、MS : 5973c inertXL MSD、Agilent Technologies、CA、USA) を用いて、分析を行った。注入方法はスプリットレスで、240 °C、3 分間香気成分を脱着し、カラムは TC-WAX (60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m、GL Sciences、CA、USA) を使用し、カラム温度は 40 °C (10 分間) $-$ 2 °C/分 (100 °C) $-$ 4 °C/分 (230 °C) $-$ 230 °C (10 分間) で、キャリアガスとして He を 1 mL/分で流し分析を行った。MS のイオン源温度は 230 °C、イオン化電圧は 70 eV、イオン化法は E I 法を用い、各ピークのフラグメントパターンはライブラリー (NIST、WILLEY) を用いて、定性解析を行ったあと、市販の標準品を用いて、マススペクトル、リテンションタイムの一致を確認した。得られた結果は内部標準法を用い、標準物質として添加した 0.1 %シクロヘキサノールのピーク面積を 100 としたときの相対含量で表した後、3 個体の平均値を算出した。さらに各サンプル間での影響を明らかにするため、多重比較検定の Tukey 法を用いて解析した (Tukey、1949 年)。また、SPME ファイバーは 260 °C で 90 分間、GC カラムは香気成分の分析条件と同様の方法で焼き出しを行い、残存がないことを確認した。

第 8 項 発酵種を使用した製パン方法

各ベーカリーで作られている発酵種の製品に対する影響を評価する目的で、4種類の発酵種サンプルを使用して、バケットを作成した。原材料として、小麦粉（product name: Merveille, Nippon Flour Mills Co., Ltd. Tokyo, Japan）2000 g、ドライイースト（product name: Lesaffre Instant Dry Yeast Red、Nichifutsu Shoji Co., Ltd.、Hyogo、Japan）8 g、食塩（product name: Hakata Salt、Hakata Salt Co., Ltd.、Ehime、Japan）40 g、モルトエキス（product name: Euromalt、 Nichifutsu Shoji Co., Ltd.）6.0 g、水 1300 mL、各ベーカリーの発酵種 200 g を使用した。それら原料をスパイラルミキサー（AS25C、株式会社愛工舎製作所）で低速で9分間混捏し、生地を作製した。また、生地は混捏終了時に生地温度が 23 °C になるように調製した。その後、温度 27 °C、湿度 75 %の恒温槽に入れ、90分間発酵させた後、350 g ずつに分割し、ベンチタイムとして 30分間、生地を寝かせた。その後、60 cm の長さになるように成型し、温度 28 °C、湿度 75 %の恒温槽で 70分間、二次発酵させた。二次発酵後、210 °C で 25分間焼成し、バケットを作製した。また、作製したバケットは 90分間冷却させ、24時間ビニール袋中で室温保存し、官能評価に使用した。

第 9 項 官能評価方法

官能評価は定量的記述式分析（QDA）法（Stone と Sidel、2004 年）に基づき、「香ばしい香り」、「サワー香」、「甘い香り」、「呈味」の風味に関する項目と「クラムのやわらかさ」、「ダマの出来やすさ」、「しっとり」、「歯切れ」の食感について官能評価項目を設定後、7点評点法で評価した。また、香ばしさの香りの質を評価する目的で、香ばしさに関する 11種類（「胚芽」、「コーヒー」、「ナッツ」、「ゴマ」、「アーモンド」、「クッキー」、「モルト」、「ポップコーン」、「醤油」、「焦

げた」、「燻製」)を提示し、該当する香りの質について、複数回答で選択させた。また、官能評価は事前に訓練した MC フードスペシャリティーズ株式会社 製品開発研究所 (茨城県稲敷郡阿見町阿見) 12 名の専門パネルで実施した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 発酵種に存在する乳酸菌種と酵母菌種について

各ベーカリーの発酵種サンプルに存在している乳酸菌種と酵母菌種の菌叢解析結果を Table 2、Table 3 に示す。その結果、ベーカリーA には乳酸菌が 1.7×10^{10} CFU/g 存在しており、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus pentosus* の 3 菌種が同定された。また、酵母菌数については 4.7×10^7 CFU/g 検出され、主要な酵母として *Saccharomyces cerevisiae*、*Candida humilis* の 2 種類が同定された。特に *Lactobacillus brevis* は 50 菌株中 37 菌株が存在しており、ベーカリーA の主要な乳酸菌であったと考えられた。ベーカリーB の発酵種には *Lactobacillus sakei* が 6.0×10^7 CFU/g、*Saccharomyces cerevisiae* が 6.0×10^2 CFU/g 存在していた。他のベーカリーに比べて特に酵母菌数が少なく、検出された乳酸菌と酵母の菌種はそれぞれ 1 種類と少なかった。ベーカリーC の発酵種中の乳酸菌数は 3.5×10^8 CFU/g、酵母菌数は 1.1×10^6 CFU/g であり、それぞれの主要な菌種は *Lactobacillus sanfranciscensis* と *Saccharomyces cerevisiae* であり、乳酸菌と酵母の比率として、100 : 1 の割合であった。ベーカリーD の発酵種については、乳酸菌数が 1.1×10^{10} CFU/g、酵母菌数が 1.2×10^9 CFU/g であった。乳酸菌種としては *Lactobacillus brevis* と *Lactobacillus vaccinoferus* の 2 種類が同定され、酵母菌種は *Saccharomyces cerevisiae* であった。*Saccharomyces cerevisiae* の生菌数は、他のベーカリーと比べて高かった。

第2項 発酵種の食品成分（pH、有機酸、糖、遊離アミノ酸）について

Table 4 には各ベーカリー発酵種の pH、有機酸量と糖量を示す。ベーカリー間でそれぞれの成分を比較したところ、乳酸、酢酸、グルコース、マルトースの量に大きな違いが認められた。ベーカリーA は最も乳酸量（7149.5 mg/kg）、酢酸量（1556.4 mg/kg）が多く、マルトース量（278.0 mg/kg）が著しく少なく、グルコースは検出されなかったことから、4 つのベーカリーの中で乳酸菌や酵母による発酵が最も進んでいると考えられた。ベーカリーB は他のベーカリーに比べて乳酸量（1504.1 mg/kg）が少なく、グルコース量（2399.2 mg/kg）が多かった。ベーカリーC は、マルトース量（23523.1 mg/kg）が最も多く、酢酸量（147.2 mg/kg）が最も少なかった。ベーカリーD の発酵種は、乳酸量（15262.7 mg/kg）および酢酸量（1027.8 mg/kg）が比較的多かったものの、マルトース量（14524.1 mg/kg）も多かった。

各サンプルの遊離アミノ酸量を Table 5 に示す。最も遊離アミノ酸総量が多かったのは、ベーカリーA の発酵種であり、次いでベーカリーD であった。評価した4 つのサンプル間で、組成が大きく異なっていた遊離アミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、アルギニン、GABA、トリプトファンであった。特にベーカリーA とベーカリーD の発酵種ではアスパラギン酸、トリプトファンが少なく、ベーカリーB はアルギニン、GABA、トリプトファンの比率が多く、ロイシン、フェニルアラニン、プロリンの比率が少なかった。また、ベーカリーC はグルタミン酸の比率が高く、プロリン、グリシン、アラニンの比率が低い傾向であった。

第3項 発酵種の香気成分の特徴について

各ベーカリーの発酵種サンプルについてヘッドスペース中の香気成分の比

較を Table 6 に示す。その結果、ベーカリーA とベーカリーD はエタノール (Ethanol; 甘い香り)、3-メチル-1-ブタノール (3-Methyl-1-Butanol ; 麦芽の香り)、フェニチルアルコール (Phenethyl alcohol ; 花のような香り) といったアルコール類に加え、酢酸エチル (Ethyl acetate)、乳酸エチル (Ethyl lactate) といったエステル類が多く検出された。ベーカリーB やベーカリーC のサンプルは全体的に香気成分量が少ない傾向であった。また、ベーカリーA やベーカリーB は他のサンプルに比べて、酢酸などサワー香に関わる香気成分の割合が多かった。

第4項 各ベーカリーの発酵種を使用したバケットの評価について

各ベーカリーから入手した発酵種を 10% 添加したバケットの官能評価結果を Fig. 2 に示す。香ばしい香りが最も強かったのはベーカリーB の発酵種を使用したバケットであり、サワー香が強く感じられたのはベーカリーA、小麦の甘い香りが感じられたのはベーカリーC とベーカリーD であった。また、ベーカリーA とベーカリーC については、咀嚼した時の味の濃さが強く感じられた。一方、食感については、しっとりした食感であったのはベーカリーA とベーカリーC であり、口内での口溶けがよかったのは、ベーカリーB であった。次に店舗ごとに差が認められた香ばしい香りについて、その香りの質の違いを Fig. 3 に示す。ベーカリーA の発酵種を使用したバケットでは胚芽やナッツ、モルトのような香ばしさが感じられたのに対し、ベーカリーB ではモルト、醤油、燻製を連想させるような重厚な香ばしさが感じられた。ベーカリーC についてはおこげのような香ばしさであるのに対し、ベーカリーD ではポップコーンのような軽い複雑な香ばしさの質であるという回答が多かった。

第4節 考察

4店舗のベーカリーの発酵種の乳酸菌数と酵母菌数を比較した結果、ベーカリーAとベーカリーDでは、酵母の比率が高い傾向が認められた。これはベーカリーAの発酵種の発酵時間が短い（25 °C、4時間）ことやベーカリーDの発酵種が生地状で調製され、27 °Cで16時間の発酵が繰り返し行われていることが影響した結果、乳酸菌より代謝や生育速度の速い *Saccharomyces cerevisiae* が優勢になったためであると考えられた。DeVuystら（2014年）はベーカリーや自家製のサワードウの従来知見について、発酵温度、発酵時間および検出された乳酸菌種をまとめている。これによると低い発酵温度では、酵母が優先して生育して発酵に関与し、エタノール生成物や香り成分が生成しやすくなり、さらに、28 °Cの発酵温度帯で24時間のような長時間の発酵を行った場合には *Lactobacillus sanfranciscensis* のようなヘテロ型の乳酸菌が優勢になりやすいと報告している（De Vuystら、2014年）。今回、ベーカリーAは4店舗の中では、もっとも低い発酵温度で短時間にて発酵種を作製しており、それらの影響により、酵母が優先して生育し、香り成分の多さに影響したのではないかと考えられた。また、ベーカリーCの発酵時間は4店舗の中で最も長い24時間であったが、その発酵時間の長さが *Lactobacillus sanfranciscensis* が優占となった原因と考えられた。一方、小麦粉と水の比率においては、小麦粉の比率が高い場合に、微生物が利用できる炭素源が増えることや高い緩衝能をもつため、酸性化に時間がかかり、微生物の増殖が改善されるといわれている（De Vuystら、2014年）。ベーカリーDの発酵種では乳酸や酢酸の量が多くなっていたが、これは発酵種の性状が生地状であり、小麦粉と水の比率が他のベーカリーと異なっていたことが影響していることが考えられた。

今回の各ベーカリーの発酵種の菌叢については、酵母に比べて、乳酸菌種がベーカリーごとに異なっており、多様であった。特にベーカリーCの発酵種から検出、同定された *Lactobacillus sanfranciscensis* はアメリカ発祥の発酵種であるサンフランシスコサワー種やイタリア発祥の発酵種であるパネトーネ種、ドイツのライ麦を使った発酵種であるライサワー種、ベルギー、ギリシャ、モロッコ、スウェーデンのライ麦粉と小麦粉で作られた発酵種であるルヴァン種から多くの検出事例があり、最もよく知られた乳酸菌種である (De Vuyst ら、2014 年)。また、ベーカリーA やベーカリーD の2か所で検出された *Lactobacillus brevis* はベルギー、イタリア、イラン、モロッコ、ロシア、スペインの小麦を使用した発酵種やドイツのライ麦を使用した発酵種から検出事例が報告されている (De Vuyst ら、2014 年 ; Minervini ら、2012 年)。 *Lactobacillus alimentarius* はドイツのライ麦を使用した発酵種やメキシコのトウモロコシを原料にした発酵種から検出されており、 *Lactobacillus sakei* についてはイタリアのナポリピザの生地から検出されている。このように、 *Lactobacillus brevis*、 *Lactobacillus alimentarius*、 *Lactobacillus pentosus*、 *Lactobacillus sakei* はこれまでもヨーロッパを中心に発酵種から多くの検出事例がある (Corsetti ら、2001 年 ; De Vuyst ら、2014 年 ; Minervini ら、2012 年)。しかし、 *Lactobacillus vaccinoferus* についてはタイの発酵食品 (Tanasupawat と Komagata、1995 年) や乾燥牛糞 (Okada ら、1979 年) から報告されているものの、発酵種から検出された事例はない。今回、ベーカリーDの発酵種から *Lactobacillus vaccinoferus* が検出された理由については不明であるが、 *Lactobacillus vaccinoferus* が発酵種やパンに与える影響や機能などについて今後さらなる検討が期待される。

本章で評価したベーカリーの発酵種中の乳酸菌種についてはベーカリーAとベーカリーDの *Lactobacillus brevis* は共通していたが、ベーカリーごとに乳酸

菌種が異なっていた。評価した発酵種は使用している原料、発酵条件（温度、時間）、繰り返し種継いでいる期間がそれぞれ異なっていたが、これらの違いが優勢な乳酸菌種の違いの原因であると考えられる。

一方、発酵種から分離された酵母についてのヨーロッパを中心とした報告では *Saccharomyces cerevisiae* だけでなく、*Candida humilis*、*Kazachstania exigua* など多様な菌種の存在が報告されている（De Vuyst ら、2016 年）。しかし、本章で評価した発酵種から検出された酵母の多くは *Saccharomyces cerevisiae* であった。本章で使った発酵種は、ベーカリーA は発酵種専用の機械で製造していたが、その他のベーカリーでは、すべて製パン作業場で行われていた。ベーカリーにてパンを製造する際に最も良く使用される工業用パン酵母の種類は *Saccharomyces cerevisiae* であり、これがベーカリーの作業場や発酵時の恒温槽などに付着し、環境中にも浮遊していると考えられる。これが本試験区にて *Saccharomyces cerevisiae* の検出が多かった主要因ではないかと考えられるため、今後ベーカリー環境による発酵種への酵母のコンタミネーションについても検討が必要である。

試作したパンの官能評価結果から、添加した発酵種の違いにより風味の強さや食感が異なることが確認された。特に香ばしい香りの質について、ベーカリーB の発酵種を添加した場合が最も香ばしい香りが強く、次いでベーカリーC、ベーカリーA、ベーカリーD の順で強さが異なった。この理由として、ベーカリーB やベーカリーC の発酵種では遊離アミノ酸量が少ないものの、グルコースやマルトースの量は他のベーカリーのものに比べて極めて多かったため、パンを製造する際の焼成工程におけるアミノカルボニル反応が促進された結果、香ばしい香りが強くなったと推察された。また、ベーカリーB やベーカリーC の発酵種そのものに含まれる他の香気成分も少なかったため、香ばしい香りが

さらに強調されたと考えられた。一方、ベーカリーAやベーカリーDの発酵種は、遊離アミノ酸は他のベーカリーのものよりも多いが、特にグルコースの量が少ないために、香ばしい香りが弱くなり、呈味を強く感じる結果になったと考えられた。ベーカリーAやベーカリーDの発酵種そのものが持つ香気成分として、エタノールや3-メチル-1-ブタノール、酢酸エチル、酢酸が多かったため、サワー香や甘い香りなどが強調されたと考えられた。香ばしい香りが強く感じられたベーカリーBやベーカリーCの発酵種を添加したパンは「醤油のような香り」、「モルトの香り」、「焦げた香り」といった香ばしさの質がそれぞれ異なっていた。これらの発酵種ではグルコースやマルトースの含量が類似していたが、アミノ酸について、ベーカリーBはアラニン、リジン、アルギニン、GABAなどが多く、ベーカリーCはグルタミン酸、ロイシン、フェニルアラニンが多くなっており、これら遊離アミノ酸種や量の差が香ばしさの質に影響している可能性が考えられた。

香ばしい香りについては、糖と遊離アミノ酸によるアミノカルボニル反応によって、生成する化合物と香りのプロファイルが変わるといわれている（Picoら、2015年）。乳酸菌はエキソ型プロテアーゼを持っており、小麦粉中の蛋白質やペプチドから遊離アミノ酸を生成し、一方で酵母や一部の乳酸菌は遊離アミノ酸を資化するといわれている（Gänzle、2014年）。また、グルコース、マルトース、フルクトースの量も酵母や乳酸菌によって資化もしくは重合化され（CorsettiとSettanni、2007年）、発酵種中の糖量に影響を与えることが知られている（Gänzle、2014年）。また、乳酸菌から生成される乳酸などによってpHが低下するが、pHもアミノカルボニル反応時の香りに影響を与えるという報告がある（Picoら、2015年）。本研究では遊離アミノ酸と糖、pHの組み合わせが、パンの香ばしさの質にどのように影響するかを検討していないが、関西

のベーカリー4店舗の発酵種の遊離アミノ酸、糖量、pHが香ばしい香りの強さや質に関与していることが考えられた。

以上のように、関西のベーカリー4店舗から入手した発酵種について解析を行った結果、微生物叢や各種成分が店舗ごとに異なっており、生育する菌種や存在割合の違いが発酵種の成分の違いに影響している可能性が考えられた。また、各発酵種を使用して焼成したパンを評価した結果、パンの香ばしい香りの質が異なった。これは各発酵種の乳酸菌種や乳酸菌数と酵母数の違いによって遊離アミノ酸や糖、pHが異なり、これらがパンの香りの質に影響を与えている可能性が考えられた。今後、純粋な乳酸菌種がパンの香りや食感の品質にどのような影響を与えているのか詳細な検討が期待される。

第5節 小括

発酵種とはライ麦粉と小麦粉と水を混捏した乳酸菌と酵母からなるpHの低い発酵物であり、パンの生地膨張や風味や食感などの品質を高める理由でベーカリーにて種継がれて、使用されている。発酵種の分析は、これまで欧米を中心に行われ、多様な乳酸菌や酵母が検出、同定されており、特に、乳酸菌については *Lactobacillus sanfranciscensis* をはじめ数多くの菌種が報告されている。しかし、日本国内のベーカリー店舗で使用されている発酵種中に含まれる乳酸菌種やその特性についての知見は少ない。本研究では、関西地区のベーカリー4店舗で種継がれ、使用されている発酵種を入手し、乳酸菌、酵母について菌種同定を行い、次いで発酵種の有機酸、糖、遊離アミノ酸、香気成分をはじめとする食品成分の特徴について評価を行った。また、各店舗の発酵種を10%添加して焼成したバケットの官能評価を行い、各店舗の発酵種がパンの品質に与える

影響について検討した。その結果、発酵種の乳酸菌叢については、4店舗ごとに検出される乳酸菌種が異なっており、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus vaccinoferus*、*Lactobacillus sanfranciscensis*、*Lactobacillus sakei* が検出、同定された。また、4店舗から検出された主要な酵母はいずれも *Saccharomyces cerevisiae* であり、一部の店舗で *Candida humilis* が検出された。4店舗の発酵種の食品成分については乳酸、酢酸、マルトース、グルコース、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、アルギニン、GABA、トリプトファンといった食品成分で違いがみられ、香気成分としては、エタノール、3-メチル-1-ブタノール、フェニチルアルコールといったアルコール類や酢酸エチル、乳酸エチルのようなエステル類で違いがみられた。各店舗の発酵種を使用したバケットについて官能評価を実施した結果、風味、食感がそれぞれ異なっており、特に香ばしい香りの強さや質は、店舗ごとに異なった。香ばしい香りは遊離アミノ酸と糖によるメイラード反応により生成することが知られているため、乳酸菌種や乳酸菌数と酵母菌数の比率が発酵種の遊離アミノ酸や糖、有機酸といった食品成分の質や量に影響し、パンの香ばしい香りの質に影響している可能性が考えられた。今後、特に乳酸菌種がパンの品質に与える影響については詳細な検討が望まれる。

Table 1. Fermentation conditions and characteristics of sourdough from each bakery

	Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
The combination ratio of raw materials (flour : water : seeds of the day before)	100:100:100	100:110:100	100:100:100	100:60:100
Tempurture and time of fermentation	25 °C, 4 h and 4 °C, 20h	28 °C, 16 h	28 °C, 24 h	27 °C, 16 h
Fermentation type	machine	handmade	handmade	handmade
Physicality of sourdough	Liquid	Liquid	Liquid	Dough
Sourdough origin	Spontaneous fermentation of rye flour and wheat flour	Spontaneous fermentation of rye flour and wheat flour	Spontaneous fermentation of rye flour and wheat flour	Spontaneous fermentation of wheat flour
Period of back-slopping	8 y	4 y	4 y	9 y

Table 2. Lactic acid bacteria in sourdough from each bakery

Species	Microflora (%)			
	Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
<i>Lactobacillus brevis</i>	74	-	-	82
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	24	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	2	-	-	-
<i>Lactobacillus vaccinoferus</i>	-	-	-	18
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	-	-	100	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	-	100	-	-
Number of isolates	50	50	50	50
Viable counts (CFU/g)*	1.7×10^{10}	6.0×10^7	3.7×10^8	4.1×10^{10}

*Viable counts of lactic acid bacteria in sourdough represent the average value of three measurements per sourdough sample.

Table 3. Yeasts in sourdough from each bakery

Species	Microflora(%)			
	Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78	100	100	100
<i>Candida humilis</i>	22	-	-	-
Number of isolates	50	50	50	50
Viable counts (CFU/g)*	4.7×10^7	6.0×10^2	1.1×10^6	1.2×10^9

* Viable counts of yeasts in sourdough represent the average value of three measurements per sourdough sample.

Table 4. Organic acids, sugars and pH in sourdough from each bakery

		Amount (mg/kg)			
		Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
Organic acids	Acetic acid	1556.4 ± 12.5	427.4 ± 3.4	147.2 ± 1.2	1027.8 ± 8.3
	Citric acid	N.D.	51.2 ± 0.4	154.6 ± 1.2	N.D.
	Fumaric acid	N.D.	18.6 ± 0.1	N.D.	N.D.
	Lactic acid	7149.5 ± 57.5	1504.1 ± 12.1	2747.0 ± 22.1	5265.7 ± 42.3
	Malic acid	N.D.	38.1 ± 0.3	N.D.	N.D.
	Succinic acid	60.5 ± 0.5	20.0 ± 0.2	18.6 ± 0.1	N.D.
Sugars	Fructose	N.D.	359.7 ± 2.9	44.5 ± 0.4	445.5 ± 3.6
	Glucose	N.D.	2399.2 ± 19.3	1752.4 ± 14.1	694.2 ± 5.6
	Maltose	278.0 ± 2.2	13837.8 ± 111.3	23523.1 ± 189.2	14524.1 ± 116.8
	Sucrose	N.D.	N.D.	460.2 ± 3.7	N.D.
pH		3.59 ± 0.01	4.02 ± 0.02	3.78 ± 0.02	3.87 ± 0.01

The data of pH, organic acids, and sugars show the average value and the standard deviation of three measurements per sourdough sample.

N.D.: not detected

Table 5. Free amino acids in sourdough from each bakery

Amino acid	Amount (mg/kg)			
	Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
Alanine	62.1 ± 1.2	46.4 ± 0.9	6.8 ± 0.1	68.1 ± 1.4
Arginine	65.3 ± 1.3	73.4 ± 1.5	34.5 ± 0.6	58.6 ± 1.2
Aspartic acid	37.7 ± 0.8	101.5 ± 2.0	102.4 ± 1.9	38.7 ± 0.8
Citrulline	35.1 ± 0.7	2.5 ± 0.0	3.4 ± 0.1	5.1 ± 0.1
Cysteine	2.6 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.9 ± 0.1	7.0 ± 0.1
GABA	75.1 ± 1.5	66.0 ± 1.3	19.4 ± 0.4	30.6 ± 0.6
Glutamic acid	119.2 ± 2.4	44.6 ± 0.9	117.6 ± 2.1	73.7 ± 1.5
Glycine	55.9 ± 1.1	15.1 ± 0.3	4.5 ± 0.1	47.0 ± 0.9
Histidine	11.2 ± 0.2	7.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	10.4 ± 0.2
Isoleucine	41.0 ± 0.8	5.3 ± 0.1	10.6 ± 0.2	21.5 ± 0.4
Leucine	99.2 ± 2.0	28.9 ± 0.6	56.0 ± 1.0	67.2 ± 1.3
Lysine	17.1 ± 0.3	22.6 ± 0.4	3.0 ± 0.1	41.5 ± 0.8
Methionine	18.7 ± 0.4	10.2 ± 0.2	11.4 ± 0.2	14.3 ± 0.3
Ornithine	3.6 ± 0.1	1.1 ± 0.0	N.D.	8.1 ± 0.2
Phenylalanine	76.1 ± 1.5	16.0 ± 0.3	44.5 ± 0.8	43.8 ± 0.9
Proline	70.0 ± 1.4	15.6 ± 0.3	8.5 ± 0.2	56.8 ± 1.1
Serine	35.0 ± 0.7	18.0 ± 0.4	22.6 ± 0.4	34.1 ± 0.7
Taurine	25.6 ± 0.5	7.1 ± 0.1	3.4 ± 0.1	47.8 ± 1.0
Threonine	25.8 ± 0.5	9.2 ± 0.2	5.2 ± 0.1	22.1 ± 0.4
Tryptophan	50.4 ± 1.0	58.8 ± 1.2	45.9 ± 0.8	14.8 ± 0.3
Tyrosine	34.3 ± 0.7	13.3 ± 0.3	19.9 ± 0.4	20.4 ± 0.4
Valine	63.0 ± 1.3	14.0 ± 0.3	22.6 ± 0.4	32.7 ± 0.7
Total	896.7 ± 17.9	461.1 ± 9.2	510.3 ± 9.3	637.6 ± 12.7

The data of free amino acids show the average value and the standard deviation of three measurements per sourdough.

N.D.: not detected

Table 6. Flavor component composition of sourdough from each bakery

	RT**	Identified compound	Relative amount*			
			Bakery A	Bakery B	Bakery C	Bakery D
Alcohols	8.334	Ethanol	235.07 ± 0.81	11.57 ± 0.36	25.58 ± 1.08	127.98 ± 0.62
	16.414	2-Methyl-1-propanol	1.64 ± 0.01	N.D.	N.D.	0.78 ± 0.93
	23.751	3-Methyl-1-butanol	35.14 ± 0.84	0.13 ± 0.01	N.D.	14.63 ± 0.90
	26.372	1-Pentanol	0.56 ± 0.17	0.31 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.47 ± 0.08
	33.42	1-Hexanol	3.82 ± 0.01	2.23 ± 0.07	1.00 ± 0.01	4.18 ± 0.04
	39.654	1-Octen-3-ol	N.D.	0.15 ± 0.01	N.D.	0.61 ± 0.08
	39.906	1-Heptanol	1.50 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.68 ± 0.05
	41.835	2-Ethyl-1-hexanol	1.04 ± 0.08	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.38 ± 0.07
	44.114	2,6-Dimethyl-4-heptanol	0.59 ± 0.06	N.D.	N.D.	N.D.
	45.029	1-Octanol	1.19 ± 0.20	0.06 ± 0.03	N.D.	0.37 ± 0.00
	45.995	trans-(2-Ethylcyclopentyl)methanol	0.84 ± 0.12	N.D.	N.D.	N.D.
	50.609	3-Methylthio-1-propanol	0.65 ± 0.12	N.D.	N.D.	0.67 ± 0.03
	57.024	Phenethyl alcohol	71.88 ± 4.09	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.03	9.28 ± 0.54
	59.407	2,4-Decadien-1-ol	0.50 ± 0.05	N.D.	N.D.	N.D.
	Esters	6.903	Ethyl acetate	43.53 ± 1.88	0.88 ± 0.10	1.06 ± 0.17
17.315		Isoamyl acetate	2.79 ± 0.16	N.D.	1.13 ± 0.00	0.81 ± 0.07
25.05		Ethyl caproate	0.51 ± 0.08	N.D.	N.D.	0.39 ± 0.06
32.305		Ethyl lactate	16.83 ± 0.34	0.57 ± 0.03	0.75 ± 0.15	5.25 ± 0.16
39.657		Ethyl caprylate	5.10 ± 0.05	N.D.	N.D.	N.D.
54.466		Phenethyl acetate	1.65 ± 0.18	N.D.	N.D.	N.D.
67.618		Isopropyl palmitate	N.D.	N.D.	N.D.	1.15 ± 0.18
67.92		Ethyl palmitate	0.44 ± 0.15	N.D.	N.D.	0.26 ± 0.06
Acids	38.471	Acetic acid	33.63 ± 3.52	9.42 ± 0.40	4.96 ± 1.05	7.83 ± 0.16
	54.965	Hexanoic acid	1.60 ± 0.21	0.56 ± 0.07	0.22 ± 0.07	0.88 ± 0.03
	61.349	Octanoic acid	2.35 ± 0.75	N.D.	N.D.	N.D.
Aldehydes	15.028	Hexanal	N.D.	0.26 ± 0.05	0.31 ± 0.13	1.53 ± 0.08
	31.558	(E)-2-Heptenal	N.D.	N.D.	N.D.	0.21 ± 0.05
	37.593	5-Ethylcyclopent-1-enecarboxaldehyde	N.D.	N.D.	N.D.	0.56 ± 0.10
Ketones	28.5	Cyclohexanone	0.88 ± 0.02	1.12 ± 0.03	1.06 ± 0.03	1.18 ± 0.06
	49.987	(-)-1-methyl-2-norcaranone	1.23 ± 0.11	0.35 ± 0.42	N.D.	N.D.
	61.098	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone	0.43 ± 0.04	N.D.	N.D.	N.D.

*Relative peak area of each peak when the value of the internal standard (0.1% cyclohexanol) is set to 100. The values are averages and the standard deviations of three measurements.

**RT, retention time.

N.D.: not detected

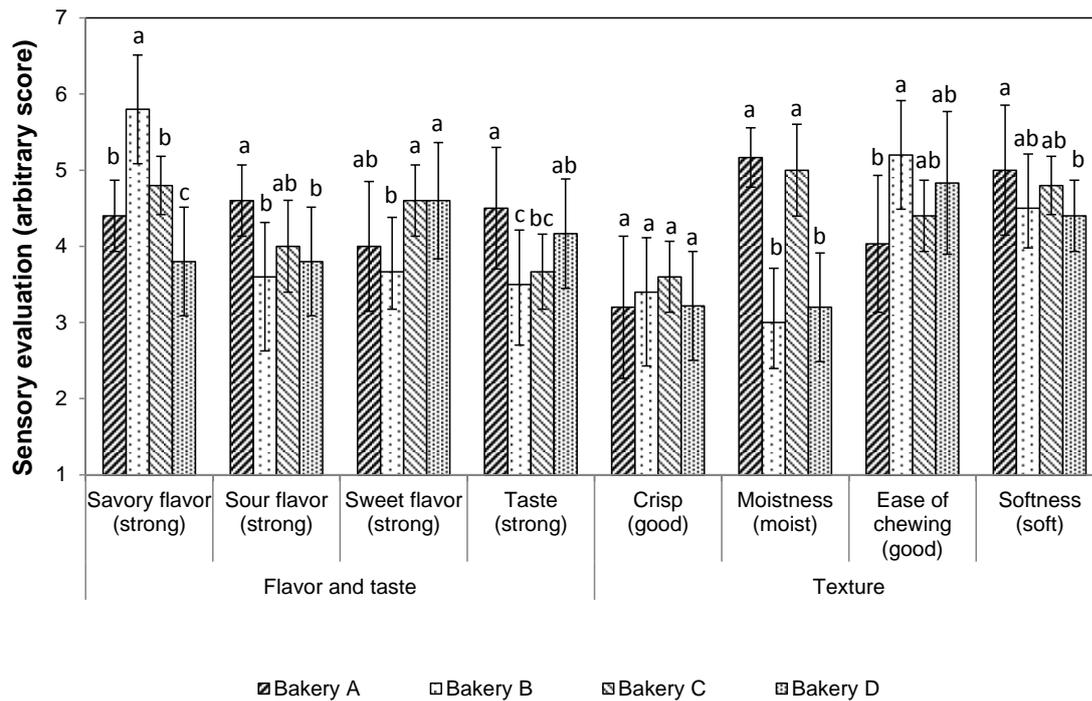


Fig. 2. Sensory evaluation of baguettes with added sourdough from each bakery

Number of panels: n = 12. Higher scores indicate stronger flavors and better mouth-feel. The data show the average value of the sensory evaluation, and the error bars show the standard deviation. Variations among bakeries were evaluated by Tukey's multiple comparison tests, and the different lowercase letters represent significant differences ($p < 0.05$).

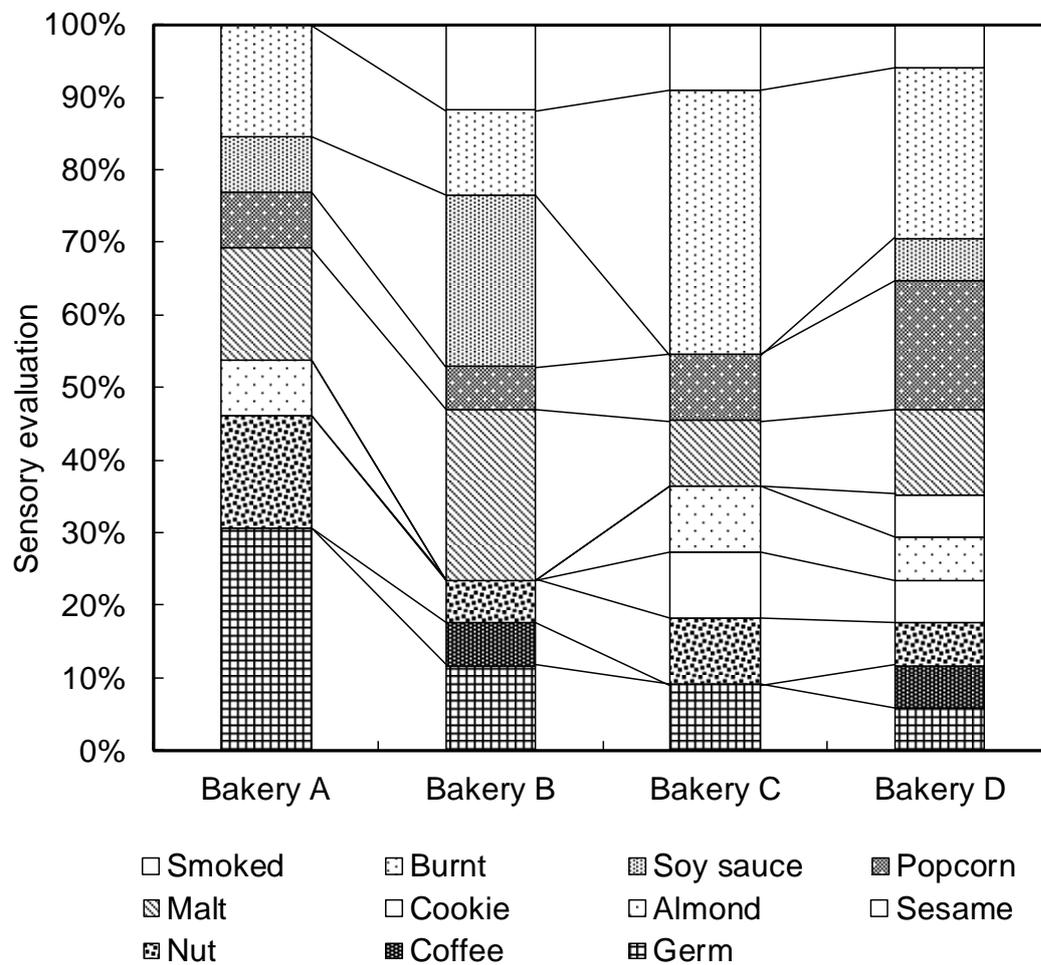


Fig. 3. Savory qualities of baguettes with added sourdough from each bakery

Eleven different descriptors were employed for the panelists to evaluate the savory qualities of the baguettes from the different bakeries (n = 12). Bar charts represent the responses of the panelists.

第3章 伝統的な発酵種の形成過程における食品成分の変化と微生物の挙動

第1節 諸言

日本にパンが伝わったのは室町時代といわれ、宣教師によって一部で広められたといわれている（越後、1976年）。その後、江戸時代に入ると鎖国の影響でパンづくりの伝承は衰退するものの、江戸時代末期には再び外国人居留地で広まり、長崎、横浜、神戸でベーカリーが誕生する。この時にパンを膨らませるためにホップの煮汁を使ったパン種であるホップス種が使われていたと伝えられている（越後、1976年）。明治時代に入ると日本人によるベーカリーが誕生するが、日本国内でホップが入手できなかったため、日本酒の酒母のような酒種を使って、日本人好みの「あんぱん」が誕生する（越後、1976年）。この「酒種」は麴と酵母の発酵によってつくられるが、パンを膨らませる以外にも、フルーティーな吟醸香が付与されることもあり、日本発祥のパン種として認められている（竹葉、1986年）。昭和に入ると大量生産式の製パン工場が誕生し、パンは学校給食にも採用されるようになり、現代にいたるまで様々な発展を遂げてきた。近年、日本のベーカリーでは、パン種の一つであるルヴァン種やサンフランシスコサワー種といった発酵種が伝わり、全国各地に普及している（竹葉、1986年）。

発酵種とは穀物と水を混捏した乳酸菌と酵母からなる発酵食品であり（Corsetti ら、2007年；De Vuyst ら、2009年；De Vuyst ら、2014年；Minervini ら、2014年；Vogelmann ら、2011年）、近年ではパンの風味（Hansen と Schieberle、

2005年) や食感 (Arendt ら、2007年)、 糊持ち (Chavan と Chavan、2011年 ; Gänzle、2014年 ; Gobbetti ら、2014年) などの品質を高める原材料として使用されている。発酵種の伝統的な製法として、ライ麦粉、小麦粉、モルトエキス、水など (De Vuyst ら、2014年 ; Vogelmann ら、2011年) を用い、6日間かけて自然発酵させる製法があり、多くの日本のベーカリーで利用されている (藤本ら、2012年)。これまで伝統的な発酵種の乳酸菌や酵母の存在については数多く報告されており (De Vuyst と Neysens、2005年 ; De Vuyst ら、2014年 ; Lhomme ら、2015年 ; Vogelmann ら、2011年 ; Weckx ら、2010年-a ; Weckx ら、2010年-b ; Weckx ら、2011年)、いくつかの研究ではフランスやイタリアの発酵種作製工程中の微生物挙動の調査結果が報告されている (Ercolini ら、2013年 ; Ferchichi ら、2007年 ; Onno と Roussel、1994年)。ただし、イタリアやフランスで行われている発酵条件と日本で多く利用されている発酵条件は異なっており、日本国内のベーカリーで行われている発酵種の製法に6日間かかる理由やその工程における微生物の生育挙動、発酵の安定性についての詳細な報告は少ない。そこで本章では日本でもっとも頻繁に用いられている伝統的な発酵種の作製工程に着目し、製粉拠点の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して、発酵種を作製したときの食品成分の変化と微生物挙動について比較検討した。食品成分については、発酵種の作製工程における有機酸、糖、遊離アミノ酸の変化と最終的に完成した発酵種の香気成分を評価した。また、同工程における酵母、乳酸菌および大腸菌群細菌の生育挙動を6日間調べた。

第2節 実験方法

第1項 使用原料

発酵種の調製において主要原料である穀物は、フランスで製粉され、日本に輸入されている Rye flour F (product name: Seigle type 130, Minoteries Viron; protein: 8.5%, ash: 1.5%, the cultivation area: France) と Wheat flour F (product name: La Traditionnelle Française, Minoteries Viron; protein: 10.5%, ash: 0.55%, the cultivation area: France) と日本で製粉され、流通されている Rye flour J (product name: Aare Fine, Nisshin Seifun Group; protein: 11%, ash: 1.3%, the cultivation area: Germany) と Wheat flour J (product name: Lys d'Or, Nisshin Seifun Group; protein: 10.7%, ash: 0.45%, the cultivation area: Canada or USA) を使用した。また、モルトエキスについてはイタリア産の Euro Malt (Nichifutsu Shoji Co., Ltd., Hyogo, Japan) を使用し、水はイオン交換水をオートクレーブ (121 °C、15 分) で滅菌した滅菌水を使用した。ライ麦粉と小麦粉は市販されているものを購入した後、速やかに使用した。

第2項 ビスコグラフによるライ麦粉と小麦粉の酵素活性評価

ライ麦粉や小麦粉の酵素活性については、一定の昇温条件で糊化させた粘度を計測するビスコグラフを用いて、評価することができる (Uno ら、1996 年)。ビスコグラフ (Viscograph-E、Brabender、Duisburg、Germany) に小麦粉もしくはライ麦粉を 65 g と水 450 mL を投入し、25 °C に設定したのち、95 °C まで 1.5 °C/分で昇温させ、5 分間保持した際の粘度を指標にして、ライ麦粉と小麦粉の酵素活性について測定を行った。

第3項 発酵種の調製方法

発酵種の調製工程は Fig. 4 に示す。まず、初日にライ麦粉 200 g、モルトエキス 4 g に滅菌水 240 g を加え、生地が 30 °C になるように十分に混合した。その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させた。1 日目には初日に発酵させた生地 200 g と小麦粉 200 g、滅菌水 200 mL を加え、生地が 28 °C になるように混合し、その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させた。2 日目以降は 1 日目と同様に前日の生地 150 g と小麦粉 150 g、滅菌水 150 mL を加え、生地が 28 °C になるように混合し、その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させる操作を 5 日目まで繰り返し行い、発酵種を調製した。なお本報告では Rye flour F と Wheat flour F を組み合わせて調製した発酵種をフランスタイプ（以下、F-sourdough と示した。）とし、Rye flour J と Wheat flour J を組み合わせて調製した発酵種を日本タイプ（以下、J-sourdough と示した。）として、それぞれの発酵種の発酵過程を評価した。サンプリングの時期については、初日は原料を混ぜ合せた直後のものをサンプリングし、1 日目以降は、発酵直後のものをサンプリングし、評価に供した。

第4項 pH 測定

発酵種サンプルをイオン交換水にて 5 倍希釈した懸濁液を作製し、pH メーター（Seven Easy pH meter、Mettler-Toledo）にて pH を測定した。

第5項 遊離アミノ酸分析

発酵種サンプル 5 g を秤量し、2 % スルホサリチル酸溶液を加え、ホモジナイズ後、遠心分離（8947 × g、5 分間）後の上清を分取した。一晩放置し、さらにタンパク質沈殿物を除いたものを 0.45 μm メンブランフィルター

(DISMIC-13CP; Advantec) でろ過し、試料として調製した。遊離アミノ酸の定量は全自動アミノ酸分析機 (JCL-500/V、JEOL Co., Ltd.) で行なった。

第 6 項 有機酸分析

5 g の発酵種サンプルを秤量し、イオン交換水にて 5 倍希釈した懸濁液を、遠心分離 (8947×g、5 分間、20 °C)により得た上清 1 mL に、20 %スルホサリチル酸を 20 μL 加え、攪拌し、0.45 μm メンブランフィルター (DISMIC-13CP; Advantec) でろ過して得たる液を分析用サンプルとした。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; LC10A Series device、Shimadzu) を用いて、下記の条件にて分析を行った。

- ・カラム : Organic Acid Column (7.8 mm×300 mm、Waters)
- ・カラム温度 : 40 °C
- ・溶媒 : A 緩衝相 (*p* トルエンスルホン酸 9.51 g を蒸留水で 100 mL にメスアップしたもの)、B 移動相 (*p* トルエンスルホン酸 9.51 g、Bis-Tris 41.85 g、EDTA-2Na 0.29 g を蒸留水で 100 mL にメスアップしたもの)
- ・流速 : A、B とともに 0.8 mL/分
- ・検出器 : RI 検出器

第 7 項 糖分析

5 g の発酵種サンプルをビーカーに秤量し、5 倍量の 50 %アセトニトリル水溶液を加え、ホモジナイズした。ホモジナイズした発酵種懸濁液は 50 mL の蓋付試験管に入れ、遠心分離 (8947×g、5 分間) 後の上清を 1 mL 分取した後、20 %スルホサリチル酸を 20 μL 加え、攪拌し、0.45 μm メンブランフィルター (DISMIC-13CP; Advantec) でろ過して得たる液を分析サンプルとした。高速

液体クロマトグラフィー（HPLC；LC10A Series device、Shimadzu）を用いて、下記の条件にて糖分析を行った。

- ・使用カラム：Asahipak NH2P 50-4E（4.6 mm×250 mm、Showa Denko KK）
- ・カラム温度：40 °C
- ・溶媒：75 %アセトニトリル
- ・流速：1.0 mL/分
- ・検出器：RI 検出器

分析には、グルコース、フルクトース、マルトース、ラクトース、スクロースの特級試薬（Kishida Chemical Co.）を超純水で希釈し、標準試薬として使用した。

第 8 項 使用した培地と生菌数測定

発酵種サンプル中に存在する微生物の菌数測定、検出は各寒天培地を使用して行なった。特に乳酸菌の検出は MRS 北原変法寒天培地（Kitahara ら、1957 年）（カゼインペプトン 10 g、肉エキス 2 g、酵母エキス 7 g、グルコース 7 g、マルトース 7 g、フルクトース 7 g、グルコン酸ナトリウム 2 g、Tween80 1 g、K₂HPO₄ 2.5 g、酢酸ナトリウム 5 g、クエン酸 2 アンモニウム 5 g、MgSO₄・7H₂O 200 mg、MnSO₄・nH₂O 50 mg、システイン塩酸塩 0.5 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH5.4）、BCP 寒天培地（酵母エキス 2.5 g、ペプトン 5.0 g、グルコース 1.0 g、ポリソルベート 80 1.0 g、L-システイン 0.1g、ブロムクレゾールパープル 0.06 g、寒天 15 g、蒸留水 1000 mL、pH 7.0、日水製薬株式会社）を使用し、グラム陰性菌の検出には CVT 寒天培地（酵母エキス 2.5g、ペプトン 5g、グルコース 1g、クリスタルバイオレット 0.001 g、トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC)

0.05 g、寒天 15 g、蒸留水 1000 mL、pH 7.0) を、酵母の検出には YPD 変法寒天培地 (グルコース 10 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、麦芽エキス 3 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH 6.2) を使用した。また、YPD 変法寒天培地には、細菌のコンタミネーションを抑制する目的で 100 mg/L クロラムフェニコール (Chloramphenicol) を加え、その他の培地には酵母や黴のコンタミを抑える目的で 10 mg/L シクロヘキシミド (Cycloheximide) を添加した。各寒天培地はあらかじめオートクレーブにて 121 °C、20 分間の滅菌を行った後、無菌的にシャーレに 30 mL 入れ、固化させた。次いで滅菌生理食塩水 (0.8% NaCl) にて段階希釈を行った発酵種サンプル 100 µL を表面塗抹し、30 °C で 48 時間培養後、1 g 中に存在する菌数の計測を行った。各菌数検査の検出限界は 100 CFU/g であり、それぞれ 3 回調製した発酵種の菌数計測を実施した。また、得られたデータについては、各菌数の平均値と標準偏差を算出した。

第 9 項 マイクロ固相抽出法 (SPME) を用いた香気成分分析

香気成分の分析にはダイナミックヘッドスペース-マイクロ固相抽出法 (SPME; Solid Phase Micro Extraction) を用いた。調製した発酵種サンプル 1 g と食塩 1 g、内部標準として 0.1 % シクロヘキサノール溶液 100 µL を 25 mL ガラスバイアル瓶に入れ、窒素ガスを充填し、密栓した。サンプルを 50 °C で 30 分間攪拌加温することで、平衡化した後、SPME ファイバー (50/30 µm Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxane、2 cm、SUPERCO) をバイアル中へ挿入し、さらに 50 °C で 30 分間攪拌しながら加温する事でバイアル中のヘッドスペース中にある香気成分を SPME に吸着させ、捕集した。捕集した香気成分をガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー (GC-MS ; GC:7890A GC system、MS : 5973c inertXL MSD、Agilent Technologies) を用いて、分析を行った。注入方法はスプ

リットレスで、240 °C、3 分間香気成分を脱着し、カラムは TC-WAX (60m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm、GL Sciences) を使用し、カラム温度は 40 °C (10 分間) −2 °C/分 (100 °C) −4 °C/分 (230 °C) −230 °C (10 分間) で、キャリアガスとして He を 1 mL/分で流し、分析を行った。MS のイオン源温度は 230 °C、イオン化電圧は 70 eV、イオン化法は E I 法を用い、各ピークのフラグメントパターンはライブラリー (NIST、WILLEY) を用いて、定性解析を行ったあと、市販の標準品を用いて、マススペクトル、リテンションタイムの一致を確認した。得られた結果は内部標準法を用い、標準物質として添加した 0.1 % シクロヘキサノールのピーク面積を 100 としたときの相対含量で表した後、3 個体の平均値を算出した。さらに各サンプル間での影響を明らかにするため、多重比較検定の Tukey 法を用いて解析した (Tukey、1949 年)。また、SPME ファイバーは 260 °C で 90 分間、GC カラムは香気成分の分析条件と同様の方法で焼き出しを行い、残存がないことを確認した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 ビスコグラフを利用したライ麦粉および小麦粉の酵素活性について

ライ麦粉や小麦粉については、それぞれアミラーゼ、プロテアーゼなどの酵素活性を有していることが知られている。本試験では使用した製粉拠点の異なるライ麦粉、小麦粉原料の酵素活性を調べることを目的に、ビスコグラフを利用し、昇温時の糊化粘度を指標にすることで、その酵素活性を評価した。Fig. 5-A から Fig. 5- D には発酵種原料である Rye flour J 、 Rye flour F と Wheat flour J、Wheat flour F の結果を示した。小麦粉については Wheat flour F の糊化温度は 80 °C、最高糊化粘度は 100 BU であり、他の粉に比べ最も糊化粘度が低く、アミラ

ーゼを中心とした酵素活性が高いと考えられた (Fig. 5-D)。一方、Wheat flour J については糊化温度 89 °C、最高糊化粘度 500 BU であり、評価した粉の中では最も糊化粘度が高く、Wheat flour F に比べ、アミラーゼやプロテアーゼといった酵素活性が低いと考えられた (Fig. 5-C)。ライ麦粉については Rye flour J の糊化温度 72 °C、最高糊化粘度は 230 BU であり (Fig. 5-A)、Rye flour F は糊化温度 85 °C、最高糊化粘度は 300 BU であった (Fig. 5-B)。特に Rye flour F と Rye flour J の最高糊化粘度に達する糊化温度は Rye flour F のほうが 13°C も高かった。これは Rye flour F のタンパク質含量が少なく、澱粉質の割合が高いことやアミラーゼやプロテアーゼなどの酵素活性が Rye flour J に比べて低いことが推察された。

第 2 項 発酵種の発酵過程における pH、有機酸、糖の成分変化

発酵種の発酵過程では、最終的に乳酸菌や酵母により、糖質が資化され、乳酸や酢酸をはじめとする有機酸を生成することにより、pH が低下することが知られている。本報告では F-sourdough と J-sourdough の発酵種の発酵過程に着目し、工程中の pH、有機酸組成、糖組成をそれぞれ Table 7-A、Table 7-B に示した。両試験区の pH は Day 2 までに 4.0 以下までに低下したが、F-sourdough は Day 1 で pH4.81 となっており、J-sourdough (pH5.93) より低かった。有機酸組成については、両試験区で乳酸と酢酸が主体であり、Day 2 に乳酸が大きく増加した。特に Day 2 の J-sourdough における乳酸量は同条件の F-sourdough より 3689 mg/kg も多く、その後の工程においても J-sourdough の乳酸量が多い傾向がみられた。一方、糖組成の変化について、両試験区を比較した場合、ライ麦粉に由来する発酵初期にマルトース量に大きな違いが認められ、Day 1 には、グルコース量およびマルトース量に違いが見られた。また、J-sourdough は Day 2 よりス

クロースが全く検出されなくなり、発酵日数の増加に伴って、グルコース、マルトースの順でその量が減少した。一方、F-sourdough では、Day 2 以降にグルコース量は微減するものの、発酵が進むにつれてマルトース量が増加した。

第3項 発酵種の発酵過程における遊離アミノ酸の成分変化

ライ麦粉および小麦粉はグルテン、アルブミン、グロブリン、グリアジンといった小麦タンパク質やペプチドやアミノ酸を含んでいる。また、アミノ酸については乳酸菌や酵母のような微生物の生育に影響が大きい(Guirard、1974年)ため、発酵種の発酵過程における遊離アミノ酸の成分変化について評価した。Table 8-A および Table 8-B にはそれぞれ F-sourdough と J-sourdough の発酵種に含まれる遊離アミノ酸組成を示した。いずれの発酵種も Day 1 から Day 3 までに遊離アミノ酸量が増えたが、Day 4 以降は減少した。Day 4 における遊離アミノ酸総量の減少率は、F-sourdough よりも J-sourdough で高かった。J-sourdough と F-sourdough の各アミノ酸量を比較した場合、J-sourdough のグルタミン酸量は、Day 0 から Day 5 にかけて、F-sourdough よりも多い傾向を示した。また、アラニンの量は、Day 3 以降に J-sourdough で多い傾向が認められた。

第4項 グラム陰性菌、乳酸菌、酵母の生菌数の変化

発酵種の発酵過程における微生物の変化については、2 試験区 (F-sourdough と J-sourdough) において評価した。Fig. 6-A および Fig. 6-B に CVT 寒天培地、MRS 北原変法寒天培地、BCP 寒天培地、YPD 変法寒天培地による生菌数測定結果を示す。両試験区において発酵過程 Day 0 から Day 1 にかけては CVT 寒天培地で 10^9 - 10^{11} CFU/g の生菌数が検出され、MRS 北原変法寒天培地、BCP 寒天培地で検出される乳酸菌数 10^7 - 10^8 CFU/g に比べて有意に多かった。次に Day 1

から Day 2 にかけては乳酸菌が 10^8 - 10^{10} CFU/g のレベルで検出され、Day 5 まで同レベルの生菌数で推移した。一方、YPD 変法寒天培地では、J-sourdough では Day 3 以降から酵母が検出され、Day 4 以降に 10^6 - 10^7 CFU/g レベルに達したが、F-sourdough については Day 4 で酵母が検出され、5 日目に 10^4 CFU/g レベルとなった。F-sourdough の発酵種では J-sourdough に比べて、酵母が検出される時期が遅く、かつ酵母菌数も少ない傾向が認められた。

第 5 項 発酵種中の香りの違いについて

F-sourdough と J-sourdough の発酵種における香気成分の測定結果を Table 9 に示す。J-sourdough では酢酸エチル (Ethyl acetate)、乳酸エチル (Ethyl lactate)、カプロン酸エチル (Ethyl caproate)、カプリル酸エチル (Ethyl caprylate) などフルーティーな香りとされるエステル類が多く検出され、さらにエタノール、2-メチルプロパノール (2-Methyl-propanol)、フェニチルアルコール (Phenethyl alcohol) といったアルコール類も多く検出された。これに対して、F-sourdough では酢酸やバター様の香りで知られるアセトイン (Acetoin)、2,3-ブタンジオール (2,3-Butanediol) などが多く検出された。

第 4 節 考察

本章では由来の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して発酵種を作製したときの工程中における微生物挙動や食品成分の比較検討を行った。本研究で用いたライ麦粉や小麦粉は日本でよく流通されるものを使用したが、それぞれ、品種、産地、製粉、流通、保管の条件がそれぞれ異なる。そこで、使用したライ麦粉と小麦粉をアミログラフにて、評価を行い、実際のライ麦粉や小麦粉の特徴を

確認した上で、発酵種の作製を試みた。

発酵種の発酵工程における糖の成分変化を調べた結果、ライ麦粉を中心に自然発酵させる工程である Day0 から Day1 にかけて糖量が大きく減少した。特に Rye flour J を使用した J-sourdough の試験区でグルコースやマルトースの量が大きく減少した理由として Day0 から Day1 にかけて生育が良かったグラム陰性菌により糖が資化されたためであると推察された。また、F-sourdough および J-sourdough における糖成分の変化を比較した場合、すべての工程でマルトースやグルコースの量が異なっていたが、これは種継ぎに使用する小麦粉の酵素活性や乳酸菌や酵母による糖の資化性が影響していると考えられた。

有機酸については F-sourdough の Day1 で酢酸量が多く、pH が低い傾向が見られた。Day1 の酢酸量が多くなった理由は不明であり、今後検証する必要がある。一方で Day2 以降の乳酸量が F-sourdough および J-sourdough 間で 3689 mg/kg と大きな差が認められたが、Day1 の酢酸量や pH の低下が Day2 での乳酸菌の代謝（乳酸発酵）に影響を与えた可能性が考えられた。

遊離アミノ酸の成分変化については小麦粉に本来含まれるプロテアーゼ活性や増殖したグラム陰性菌もしくは乳酸菌によりタンパク質やペプチドが分解されて、増加することが知られている（Gobbetti ら、1994 年）。本試験区では発酵種作製工程中の遊離アミノ酸が発酵初期に増える傾向が認められたが、それは穀物や乳酸菌、グラム陰性菌由来のプロテアーゼの影響により増加したことが考えられた。また、Day4 以降の遊離アミノ酸量が全体的に減少した点については酵母の生育と共に遊離アミノ酸が資化され、減少したためと考えられた。特に Day4 では F-sourdough の遊離アミノ酸量は J-sourdough と比べると多かったが、これは F-sourdough の Day4 における酵母菌数が低く、酵母による資化が少なかったことが影響していると考えられた。

日本とフランス（ヨーロッパ）ではライ麦粉や小麦粉の原産地だけでなく、蛋白質や灰分といった品質規格や製粉方法なども異なる（Veraverbeke と Delcour、2002 年）。本章で用いたフランスで製粉されたライ麦粉（Rye flour F）や小麦粉（Wheat flour F）と日本で製粉されたライ麦粉（Rye flour J）や小麦粉（Wheat flour J）では蛋白質組成が異なっており、日本で製粉された小麦粉（Wheat flour J）はグルテンの伸展性が強く、酵素活性が低い。今回の結果は、これらライ麦粉と小麦粉の違いが、発酵種の形成中における食品成分と乳酸菌と酵母の挙動に影響を与えたと考えられた。

特にライ麦粉は発酵初期の食品成分やグラム陰性菌の挙動に影響し、その結果としてその後の乳酸菌や酵母の生育挙動に影響するため、ライ麦粉の種類は発酵種の発酵工程において、重要な因子であると考えられた。Ercolini ら（2013 年）はライ麦粉と小麦粉を原料にしてイタリアの伝統的な自然発酵の製法でつくった発酵種の乳酸菌、酵母、*Enterobacteriaceae* の挙動を 11 日間にわたり評価している。この製法は日本で用いられる製法と比べて異なっており、25 °C で 5 時間（1 回目のみ 8 時間）の自然発酵と 16 時間の冷却を 11 回繰り返すため、pH の低下が緩やかで、11 日目に pH 4 まで低下する傾向を示しており、乳酸菌、酵母、*Enterobacteriaceae* の生育挙動も本結果と異なる。このような、25 °C という低めの温度で、さらに発酵時間を短くし、種継回数を増やすような条件で発酵させた場合には、酵母の増殖が早くなる傾向にある（Ercolini ら、2013 年）ため、これは発酵種に良好な香りを与えるなどの利点を有すると考えられている。ヨーロッパでは、日本に比べて、発酵種の普及が進んでおり、発酵種製造においては、専用機械を使い、詳細な発酵時間や発酵温度や攪拌などを制御しながら発酵種を製造することが一般的に行われている。日本でも一部でそのような発酵種製造用の専用機械はあるものの、ヨーロッパほどに発酵種を使用するこ

とが普及していないため、Table 1 のような手作業で管理されることが多い。日本でよく利用されている発酵種の発酵工程は、6 日間の過程において発酵種中の糖、有機酸、遊離アミノ酸などの食品成分が変化したが、自然発酵の温度（28 °C）と時間（24 時間）が乳酸菌の生育やそれに伴う pH の低下を早め、グラム陰性菌の死滅を促進したと考えられる。発酵種の品質安定性の観点から見た場合には、発酵時間が短い場合に pH や温度の管理を誤るとグラム陰性菌などに汚染されやすくなるため、乳酸菌が十分に生育できる発酵時間が長い 28 °C、24 時間の本製法が日本では多くのベーカリーで採用されているのではないかと考えられた。今後、発酵温度や発酵時間が短くなった場合の発酵種の品質については、さらに評価が必要である。

F-sourdough ではサワー香や酸味を呈する酢酸やバター様の香りを呈するアセトイン、2,3-ブタンジオールといった香気成分が多かったのに対して、J-sourdough の発酵種はフルーティーな香りを呈するエステル類やアルコール類が多く検出された。これら発酵種で確認されたフレーバー成分の違いは、乳酸菌と酵母の両方に起因する可能性が報告されている（Ravyts と De Vuyst、2011 年）。酢酸やエタノール、酢酸エチル、イソブタノール、イソアミルアルコールといった主要な揮発性香気成分は 30 °C 発酵により増加し、ヘテロ型乳酸菌や酵母が優勢になった液体発酵種で多いことがよく知られている（Ravyts と De Vuyst、2011 年；Weckx ら、2010 年-a）。酢酸エチルは酵母によって生成したエタノールと酢酸が反応してできた可能性が高いが、他のエステル類は発酵種中で増殖した酵母により発酵の過程で生成されたと考えられた（De Vuyst ら、2016 年）。フェネチルアルコールはフェニルアラニンが酵母を介して生成されていることやメチルプロパノールは酵母を介してバリンから生成されることが知られている（Etschmann ら、2002 年）。3-メチル-1-ブタノールは酵母を介して前駆体

であるロイシンから生成されるが、発酵種の pH が 4.0 より低くなった場合には、穀物由来のアスパラギン酸プロテアーゼによりグルテンの分解が促進され、ロイシン量の増加を引き起こすとされている (Bleukx ら、1998 ; Thiele ら、2002 年 ; Thiele ら、2004 年)。これらのことから、本章で作製した発酵種 (J-sourdough と F-sourdough) ではそれぞれ酵母の生育挙動が異なったが、酵母の生菌数は発酵種のアミノ酸量や発酵種の香りに影響を与える可能性が考えられた。

本章では、発酵種製造工程において微生物種の同定を実施していないが、ライ麦や小麦粉そのものには、*Pantoea* 属、*Enterobacter* 属、*Pseudomonas* 属といったグラム陰性菌が多く存在していることが知られている (Ercolini ら、2013 年)。また世界各国の発酵種においては、乳酸菌として *Lactobacillus sanfranciscensis* および *Lactobacillus plantarum* が (Gobbetti ら、2016 年)、また、酵母として *Saccharomyces cerevisiae* および *Candida humilis* (De Vuyst ら、2016 年) を中心に数多くの菌種が同定されている。今後、微生物の同定を通じて香気成分生成に対する微生物の影響を検証することが課題である。

一方、パンとは異なるジャンルだが、日本酒の品評会で上位にランキングされるものはエステルに由来するフルーティーな香りのものが多い (Takahashi ら、2014 年) とされており、日本ではフルーティーな香りを好む傾向がある。パンにおいても、フルーティーな香りや甘い香りといった発酵の香りのほうがより好まれるため (Pico ら、2015 年)、サワー香につながる酢酸のような香気成分よりも酢酸エチルやフェネチルアルコールのような香気成分のほうが好ましいと考えられた。

上記のように日本のベーカリーでよく使われている 28 °C、24 時間の発酵条件は日本で製粉されたライ麦粉、小麦粉の特性に適した製法となっていると考えられるため、28 °C、24 時間の発酵方法に限定した場合には、日本で製粉

されたライ麦粉や小麦粉を使用することが推奨される。

日本では、多くのベーカリーが、それぞれ異なる原料を使用して、発酵種の作製を行っているが、原料であるライ麦粉や小麦粉の種類は非常に多く、その成分の違いや乳酸菌、酵母の菌叢等は不明な点が多い。今後、日本のベーカリーで作製される発酵種の食品成分や菌叢との関係性について、さらに解明していくことが期待される。

第5節 小括

発酵種とは穀物と水を混捏した乳酸菌と酵母からなる発酵食品である。発酵種の伝統的な製法として、ライ麦粉、小麦粉、モルトエキス、水などを混合して6日間かけて自然発酵させる製法があり、多くの日本のベーカリーで利用されている。本章では伝統的な発酵種の作製工程に着目し、製粉拠点の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して作製した発酵種の作製工程における食品成分と微生物の挙動について比較検討した。食品成分については、有機酸、糖、遊離アミノ酸の変化を、微生物の挙動については各培地（CVT、BCP、MRS 変法、YPD 変法）で検出される6日間の生菌数変化を調べた。その結果、タイプの異なる発酵種はいずれも発酵2日目には乳酸量が大きく増加し、発酵4日目以降には遊離アミノ酸量が減る傾向を示した。特にフランスで製粉した原料を使った発酵種は全体的に生成する乳酸量が少なく、グルコース、スクロースを中心に糖量の変動が少なかった。また、日本で製粉された原料を使った発酵種の糖量は発酵1日目でグルコース、マルトースを中心に減少し、2日目以降に増加したものの、発酵5日目にかけて緩やかに減少する傾向が見られた。一方、微生物挙動については使用した原料の種類に関わらず、発酵2日目にはBCP培地および

MRS 変法培地で検出される乳酸菌が優勢になった。また、酵母についてはフランスで製粉された原料を用いた場合には3日目まで酵母が検出されない場合もあった。日本で製粉された原料を用いた場合には発酵3日目以降にYPD 変法培地から酵母が検出されたが、作製したロットにより酵母菌数の挙動に大きな違いは認められなかった。発酵種の香り成分としては、フランスで製粉された原料では酸類が多く検出されたのに対して、日本で製粉された原料ではエステル類やアルコール類が多く検出され、発酵種の品質として好ましいものであった。

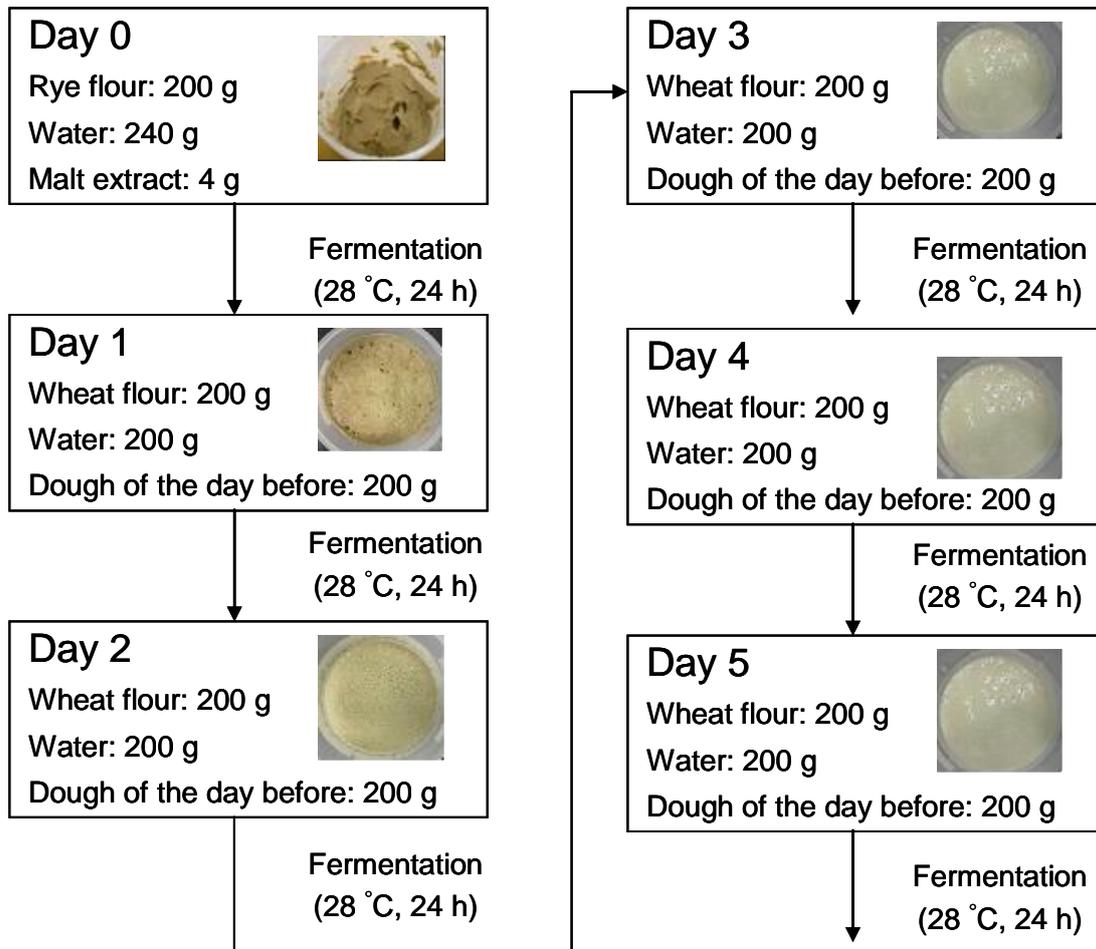


Fig. 4. The sourdough production method used in this study

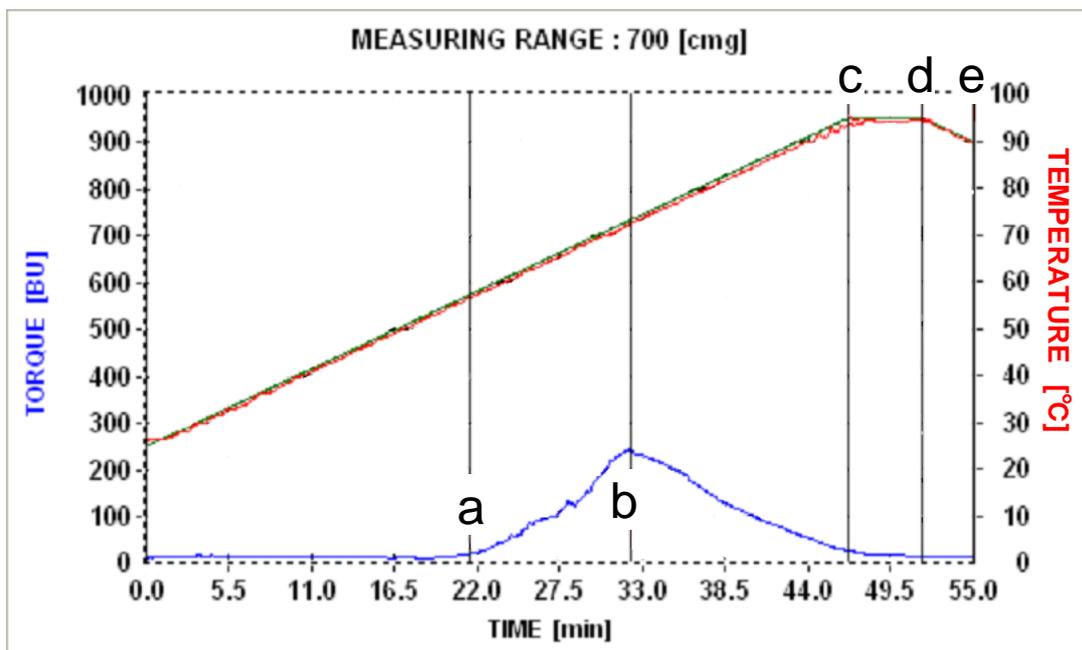


Fig. 5-A. Viscographic evaluation of enzyme activity in rye flour J.

(a): Beginning of gelatinization, (b): Maximum viscosity, (c): Start of holding period, (d): Start of cooling period, (e): End of cooling period

Temperature of sample: Red line, Viscosity (BU) of sample: Blue line

The lower the maximum viscosity is expressed the higher the enzymatic activity of the flour.

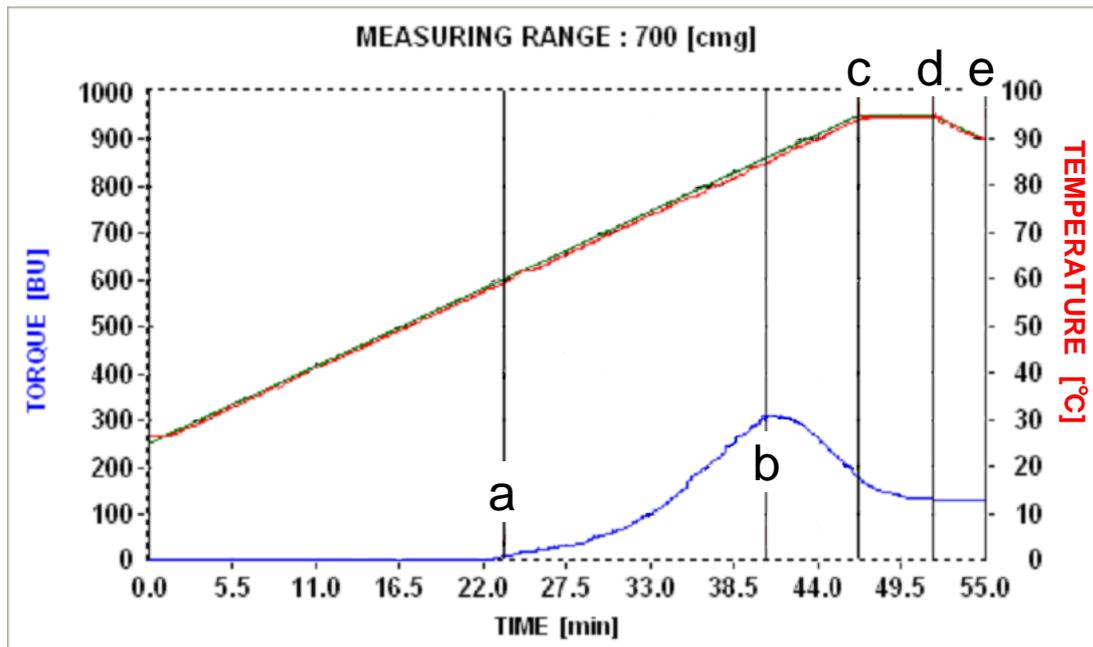


Fig. 5-B. Viscographic evaluation of enzyme activity in rye flour F.

(a): Beginning of gelatinization, (b): Maximum viscosity, (c): Start of holding period, (d): Start of cooling period, (e): End of cooling period

Temperature of sample: Red line, Viscosity (BU) of sample: Blue line

The lower the maximum viscosity is expressed the higher the enzymatic activity of the flour.

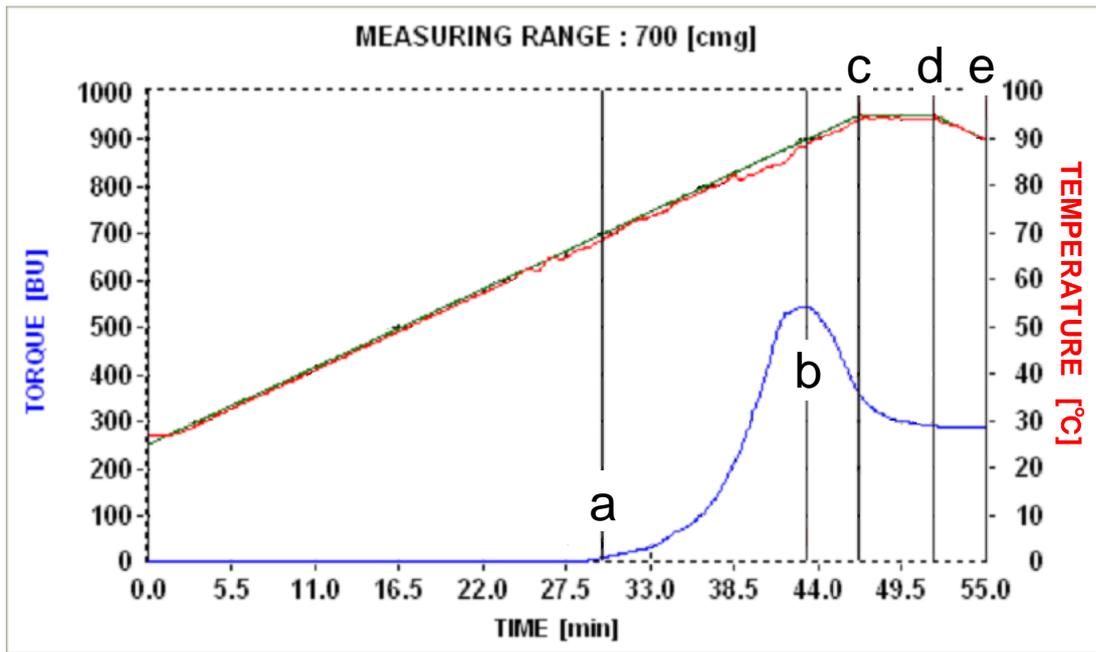


Fig. 5-C. Viscographic evaluation of enzyme activity in wheat flour J.

(a): Beginning of gelatinization, (b): Maximum viscosity, (c): Start of holding period, (d): Start of cooling period, (e): End of cooling period

Temperature of sample: Red line, Viscosity (BU) of sample: Blue line

The lower the maximum viscosity is expressed the higher the enzymatic activity of the flour.

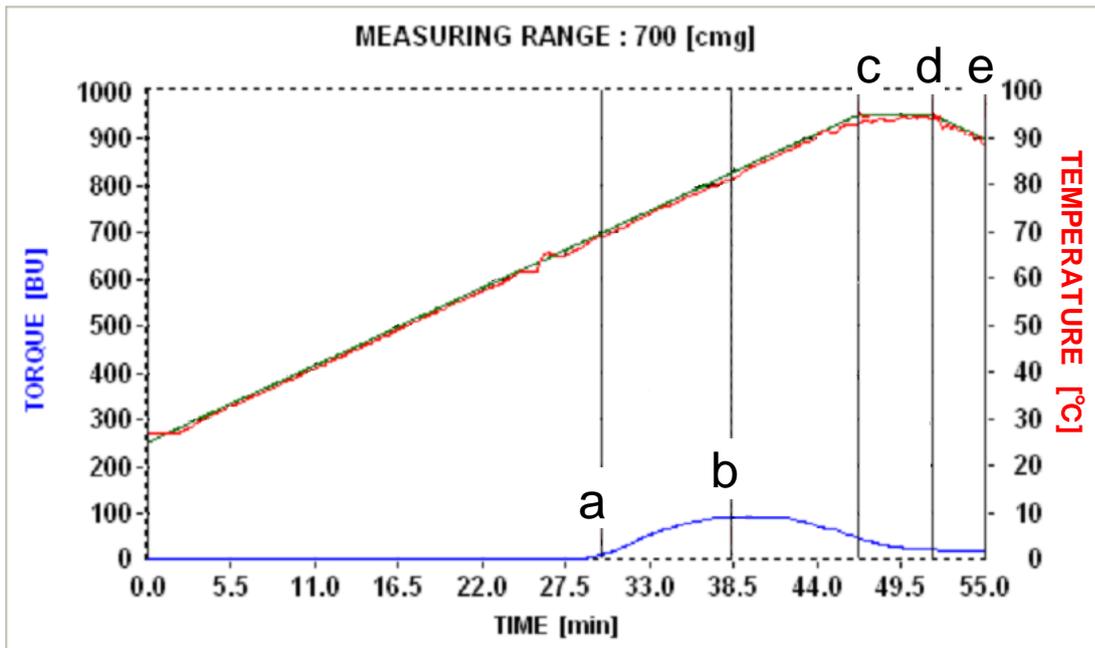


Fig. 5-D. Viscographic evaluation of enzyme activity in wheat flour F.

(a): Beginning of gelatinization, (b): Maximum viscosity, (c): Start of holding period, (d): Start of cooling period, (e): End of cooling period

Temperature of sample: Red line, Viscosity (BU) of sample: Blue line

The lower the maximum viscosity is expressed the higher the enzymatic activity of the flour.

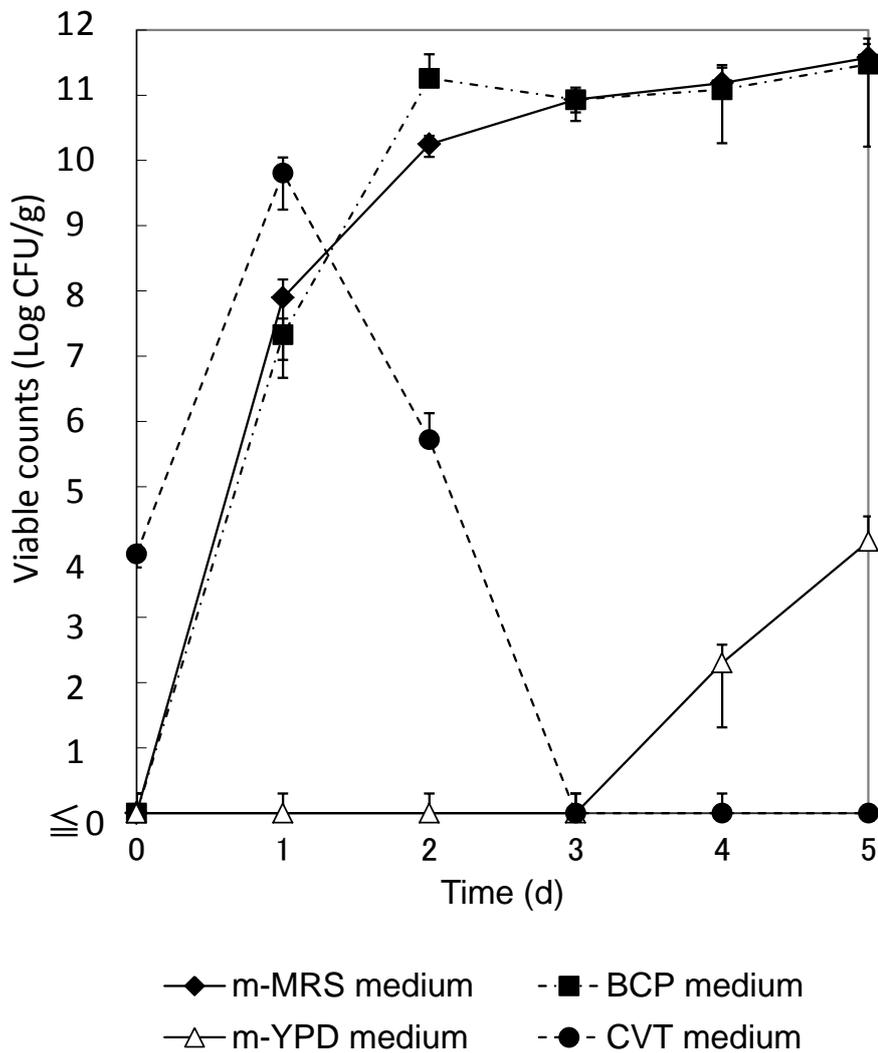


Fig. 6-A. Microbial behavior during F-sourdough production process using rye flour F and wheat flour F

Sampling method: On day 0, sampling was performed immediately after mixing the ingredients. Day 1 onwards, sampling and evaluation were performed immediately after fermentation.

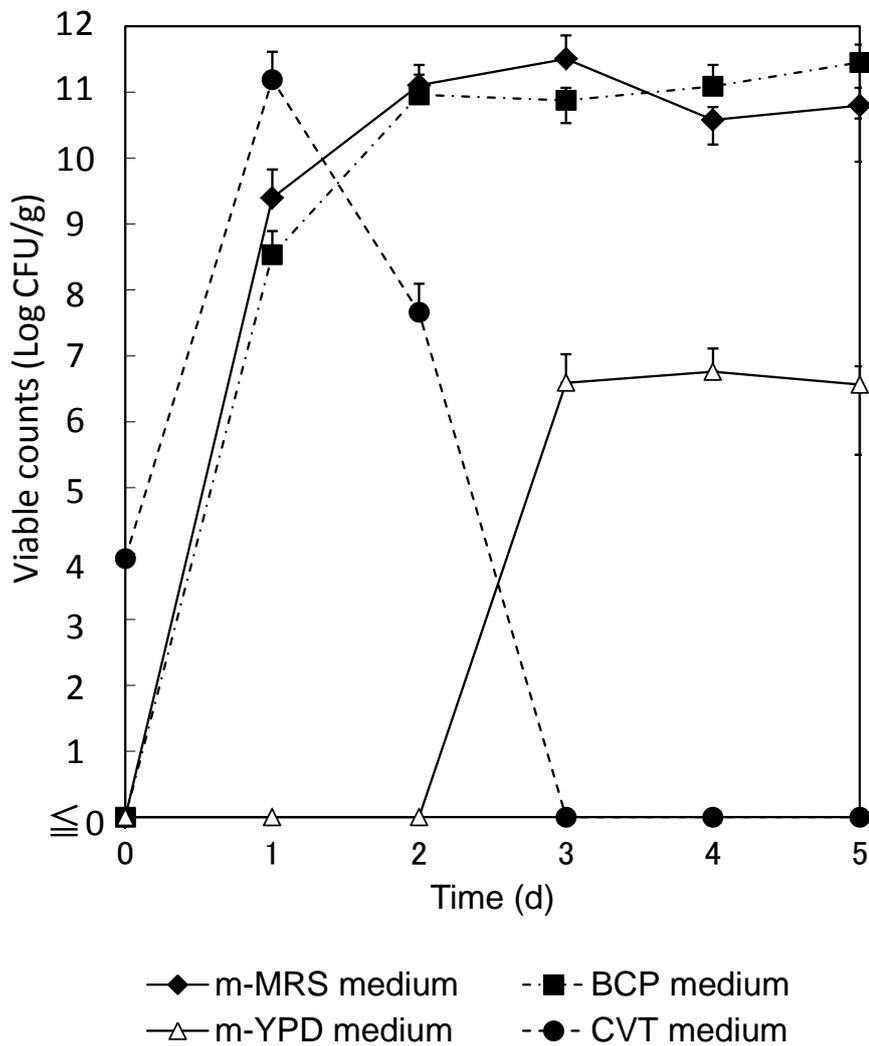


Fig. 6-B. Microbial behavior during J-sourdough production process using rye flour J and wheat flour J.

Sampling method: On day 0, sampling was performed immediately after mixing the ingredients. Day 1 onwards, sampling and evaluation were performed immediately after fermentation.

Table 7-A. Changes in pH and organic acid and sugar levels during F-sourdough production process using rye flour F and wheat flour F

		Amount (mg/kg)					
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
	pH	6.09	4.81	3.82	3.61	3.61	3.61
Organic acids	Acetic acid	12 ± 4	627 ± 16	1183 ± 33	1016 ± 12	835 ± 21	734 ± 13
	Fumaric acid	153 ± 6	21 ± 45	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Lactic acid	N.D.	891 ± 25	3547 ± 55	6046 ± 49	5931 ± 31	6160 ± 39
	Malic acid	292 ± 10	9 ± 5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Succinic acid	N.D.	540 ± 4	420 ± 23	172 ± 59	91 ± 37	80 ± 8
	total	457 ± 10	2089 ± 9	5150 ± 23	7234 ± 59	6857 ± 37	6973 ± 8
Sugar	Fructose	2680 ± 45	1989 ± 285	2619 ± 460	2088 ± 232	1691 ± 84	1450 ± 62
	Glucose	4103 ± 35	7025 ± 468	5776 ± 305	6259 ± 315	4212 ± 232	3458 ± 162
	Lactose	1508 ± 2	1508 ± 2	1508 ± 2	1508 ± 2	1508 ± 2	1508 ± 2
	Maltose	6667 ± 498	1165 ± 330	4821 ± 590	7849 ± 194	7253 ± 589	9902 ± 497
	Sucrose	2434 ± 13	1530 ± 99	1553 ± 195	1808 ± 116	1643 ± 78	2199 ± 82
	total	17392 ± 594	13216 ± 1184	16277 ± 1551	19511 ± 859	16308 ± 985	18517 ± 804

The combination of flour material: F-sourdough is rye flour F and wheat flour F.

N.D.: not detected.

Table 7-B. Changes in pH and organic acid and sugar levels during J-sourdough production process using rye flour J and wheat flour J

		Amount (mg/kg)					
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
	pH	6.73	5.93	3.97	3.66	3.64	3.62
Organic acids	Acetic acid	39 ± 2	106 ± 2	1016 ± 42	1030 ± 67	997 ± 22	831 ± 34
	Fumaric acid	121 ± 7	112 ± 19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	Lactic acid	N.D.	621 ± 20	7236 ± 44	7649 ± 49	7894 ± 22	7238 ± 18
	Malic acid	351 ± 9	20 ± 5	38 ± 16	38 ± 15	36 ± 7	8 ± 2
	Succinic acid	N.D.	648 ± 15	667 ± 12	290 ± 6	165 ± 8	96 ± 2
	total	512 ± 9	1507 ± 20	8958 ± 28	9007 ± 21	9091 ± 15	8172 ± 4
Sugar	Furctose	3119 ± 59	1999 ± 450	2691 ± 639	1869 ± 139	1907 ± 169	1564 ± 173
	Glucose	5018 ± 60	2903 ± 369	8043 ± 784	6776 ± 495	3176 ± 1433	2157 ± 616
	Lactose	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1655 ± 843	2903 ± 926
	Maltose	11047 ± 398	8450 ± 818	11987 ± 737	11609 ± 1839	13936 ± 2082	6318 ± 1468
	Sucrose	3897 ± 63	1810 ± 208	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	total	23082 ± 580	15162 ± 1845	22721 ± 2160	20254 ± 2473	20674 ± 4527	12942 ± 3182

The combination of flour material:J-sourdough is rye flour J and wheat flour J.

N.D.: not detected.

Table 8-A. Changes in free amino acid levels during F-sourdough production process using rye flour F and wheat flour F

	Amount (mg/kg)					
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Alanine	53 ± 6	199 ± 24	123 ± 14	97 ± 29	73 ± 24	32 ± 8
Arginine	77 ± 8	146 ± 4	14 ± 3	N.D.	9 ± 4	5 ± 3
Aspartic acid	151 ± 5	12 ± 5	45 ± 26	114 ± 16	125 ± 20	64 ± 7
Glutamic acid	96 ± 2	55 ± 9	166 ± 20	224 ± 29	205 ± 25	89 ± 18
Glycine	22 ± 2	78 ± 3	37 ± 4	50 ± 7	38 ± 29	19 ± 10
Histidine	11 ± 1	33 ± 17	27 ± 10	29 ± 18	17 ± 6	9 ± 1
Hydroxyproline	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isoleucine	16 ± 3	20 ± 7	51 ± 20	96 ± 4	89 ± 27	39 ± 8
Leucine	17 ± 2	74 ± 10	169 ± 36	258 ± 31	244 ± 27	114 ± 20
Lysine	24 ± 1	52 ± 6	73 ± 13	73 ± 12	47 ± 5	35 ± 17
Methionine	N.D.	18 ± 4	29 ± 7	4 ± 1	46 ± 12	23 ± 9
Phenylalanine	12 ± 2	36 ± 14	110 ± 27	171 ± 24	168 ± 25	78 ± 15
Proline	63 ± 5	195 ± 29	104 ± 10	100 ± 20	77 ± 27	25 ± 19
Serine	19 ± 2	8 ± 3	41 ± 5	53 ± 24	38 ± 23	16 ± 5
Threonine	13 ± 6	6 ± 3	34 ± 6	44 ± 12	38 ± 13	21 ± 4
Tyrosine	11 ± 2	21 ± 8	39 ± 17	55 ± 26	18 ± 10	5 ± 2
Valine	11 ± 1	70 ± 2	90 ± 7	124 ± 8	111 ± 11	60 ± 3
total	596 ± 34	1023 ± 121	1151 ± 208	1493 ± 232	1362 ± 258	633 ± 138

N.D.: not detected

Table 8-B. Changes in free amino acid levels during J-sourdough production process using rye flour J and wheat flour J

	Amount (mg/kg)					
	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Alanine	59 ± 7	186 ± 21	156 ± 12	143 ± 13	111 ± 8	60 ± 15
Arginine	60 ± 5	101 ± 2	6 ± 1	N.D.	5 ± 2	N.D.
Aspartic acid	237 ± 7	91 ± 14	65 ± 9	131 ± 18	95 ± 15	51 ± 6
Glutamic acid	197 ± 3	124 ± 18	211 ± 25	300 ± 28	230 ± 25	132 ± 26
Glycine	17 ± 2	84 ± 3	84 ± 8	66 ± 10	56 ± 42	47 ± 25
Histidine	19 ± 1	48 ± 25	35 ± 13	39 ± 25	29 ± 10	19 ± 2
Hydroxyproline	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Isoleucine	10 ± 2	47 ± 18	54 ± 13	91 ± 4	72 ± 39	43 ± 23
Leucine	11 ± 1	69 ± 8	167 ± 24	281 ± 31	193 ± 23	113 ± 16
Lysine	20 ± 1	80 ± 9	59 ± 10	85 ± 9	29 ± 2	12 ± 6
Methionine	4 ± 1	22 ± 5	35 ± 10	60 ± 20	39 ± 10	22 ± 9
Phenylalanine	9 ± 1	48 ± 20	102 ± 25	166 ± 23	131 ± 16	86 ± 16
Proline	28 ± 2	68 ± 12	60 ± 3	70 ± 12	58 ± 20	39 ± 13
Serine	13 ± 2	N.D.	32 ± 14	52 ± 23	10 ± 6	5 ± 2
Threonine	12 ± 6	52 ± 18	29 ± 17	39 ± 11	17 ± 6	8 ± 1
Tyrosine	9 ± 2	30 ± 11	5 ± 2	N.D.	N.D.	N.D.
Valine	15 ± 2	82 ± 2	112 ± 8	119 ± 8	99 ± 7	68 ± 4
total	719 ± 33	1130 ± 163	1212 ± 182	1641 ± 221	1174 ± 222	705 ± 148

N.D.: not detected

Table 9. Flavor compounds detected from the headspace of each sourdough type on fermentation day 5

	RT	Identified compound	Relative amount*	
			F-sourdough	J-sourdough
Acids	38.042	Acetic acid	101.11 ± 5.56	26.10 ± 2.94
	47.354	Butanoic acid	3.93 ± 0.14	N.D.
	49.075	Pentanoic acid	1.90 ± 1.98	N.D.
	55.099	Hexanoic acid	5.81 ± 0.35	1.85 ± 0.50
	61.502	Octanoic acid	0.92 ± 0.27	0.75 ± 0.27
	64.382	Nonanoic acid	0.66 ± 0.51	1.13 ± 0.19
	67.12	Decanoic acid	0.42 ± 0.18	0.72 ± 0.18
Esters	7.013	Ethyl acetate	68.57 ± 9.07	84.35 ± 23.46
	12.814	Ethyl butanoate	1.01 ± 0.18	N.D.
	17.776	Isoamyl acetate	1.85 ± 1.27	3.20 ± 1.74
	19.047	Ethyl pentanoate	0.32 ± 0.04	N.D.
	26.16	Ethyl caproate	2.55 ± 0.16	4.89 ± 0.82
	32.48	Ethyl lactate	10.55 ± 0.88	66.62 ± 9.23
	40.153	Ethyl caprylate	N.D.	3.10 ± 0.87
	44.361	Ethyl dl-2-hydroxycaproate	0.39 ± 0.04	N.D.
	45.524	3-Methoxyisobutyl acetate	N.D.	6.29 ± 2.58
	49.771	Diethyl succinate	N.D.	1.00 ± 0.23
	53.706	Ethyl phenylacetate	N.D.	N.D.
	54.708	Phenethyl acetate	N.D.	0.35 ± 0.28
	64.093	Tributyl phosphate	0.15 ± 0.01	0.57 ± 0.28
Alcohols	8.276	Ethanol	44.32 ± 2.16	248.37 ± 33.31
	16.042	2-Methyl-1-propanol	0.34 ± 0.16	2.29 ± 0.10
	23.329	3-Methyl-1-butanol	4.45 ± 0.33	41.69 ± 6.17
	39.928	1-Octen-3-ol	0.77 ± 0.09	0.79 ± 0.25
	43.593	2,3-Butanediol	2.33 ± 1.72	N.D.
	50.816	3-Methylthio-1-propanol	N.D.	0.74 ± 0.12
	57.227	Phenethyl alcohol	1.03 ± 0.09	17.45 ± 2.75
	62.451	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	N.D.	0.46 ± 0.16
Ketones	28.164	Acetoin	6.89 ± 0.53	N.D.
	28.765	Cyclohexanone	1.35 ± 0.11	N.D.
	61.287	Dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone	0.36 ± 0.04	0.32 ± 0.06
Aldehydes	15.219	Hexanal	1.07 ± 0.33	1.82 ± 0.70
	31.921	(E)-2-Heptenal	0.22 ± 0.06	N.D.

*Relative peak area of each peak when the value of the internal standard (0.1% cyclohexanol) is set as 100. These values are the average of three individual measurements. ** RT is retention time
N.D.: not detected

第4章 伝統的な発酵種工程の菌叢に与える原料の影響について

第1節 諸言

第3章では発酵種の伝統的な製法として、ライ麦粉、小麦粉、モルトエキス、水などを用い、6日間かけて自然発酵させる製法の工程に製粉拠点の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して、発酵種を作製したときの食品成分と微生物挙動について比較検討した。その結果として、微生物挙動については使用した原料の種類に関わらず、発酵1日目にはCVT培地でグラム陰性菌が生育し、発酵2日目にはMRS変法培地で検出される乳酸菌が優勢になった。酵母についてはフランスで製粉された原料を用いた場合には3日目までに酵母が検出されない場合もあったものの、日本で製粉された原料を用いた場合には発酵3日目以降にYPD変法培地から酵母が検出され、作製したロットにより酵母菌数の挙動に大きな違いは認められなかった。このように原料に使用するライ麦粉と小麦粉の由来によって、微生物の挙動が異なることが確認されたが、本章では第3章で検討を行った日本で製粉された同じ原料を使用して調製した発酵種（J-sourdough）について、ライ麦粉、小麦粉のロットを変えた際の菌叢の変化について調べた。

第2節 実験方法

第1項 使用原料

発酵種の調製において主要原料である穀物は、日本で製粉され、流通しているライ麦粉（product name: Aare Fine, Nisshin Seifun Group; protein: 11%, ash: 1.3%, the cultivation area: Germany）と小麦粉（product name: Lys d'Or, Nisshin

Seifun Group; protein: 10.7%, ash: 0.45%, the cultivation area: Canada or USA) を使用した。ライ麦粉と小麦粉は 2012 年 12 月 10 日と 2013 年 11 月 19 日に購入したロットをそれぞれ速やかに使用した。また、モルトエキスについてはイタリア産の Euro Malt (Nichifutsu Shoji Co., Ltd.) を使用し、水はイオン交換水をオートクレーブ (121 °C、15 分間) 滅菌した滅菌水を使用した。

第 2 項 発酵種の調製方法

発酵種の調製は第 3 章の調製方法 (Fig. 4) に準じて行った。すなわち、初日にライ麦粉 200 g、モルトエキス 4 g に滅菌水 240 g を加え、生地が 30 °C になるように十分に混合した。その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させた。1 日目には初日に発酵させた生地 200 g と小麦粉 200 g、滅菌水 200 mL を加え、生地が 28 °C になるように混合し、その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させた。2 日目以降は 1 日目と同様に前日の生地 150 g と小麦粉 150 g、滅菌水 150 mL を加え、生地が 28 °C になるように混合し、その後 28 °C のインキュベーター中で 24 時間発酵させる操作を 5 日目まで繰り返し行い、発酵種を調製した。サンプリングの時期については初日では原料を混ぜ合せた直後のものをサンプリングし、1 日目以降のものは、発酵直後のものをサンプリングし、評価に供した。なお、2012 年と 2013 年に購入したロットをそれぞれ J-sourdough A と J-sourdough B として使用した。

第 3 項 pH 測定

発酵種サンプルをイオン交換水にて 5 倍希釈した懸濁液を作製し、pH メーター (Seven Easy pH meter、Mettler-Toledo) にて pH を測定した。

第4項 使用した培地と菌数測定

発酵種サンプル中に存在する微生物の検出、菌数測定は第3章と同様の寒天培地を使用して行なった。特に乳酸菌の検出は MRS 北原変法寒天培地（カゼインペプトン 10 g、肉エキス 2 g、酵母エキス 7 g、グルコース 7 g、マルトース 7 g、フルクトース 7 g、グルコン酸ナトリウム 2 g、Tween80 1 g、 K_2HPO_4 2.5 g、酢酸ナトリウム 5 g、クエン酸 2 アンモニウム 5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、200 mg、 $MnSO_4 \cdot nH_2O$ 50 mg、システイン塩酸塩 0.5 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH 5.4）（Kitahara ら、1957 年）を使用し、グラム陰性菌の検出には CVT 寒天培地（酵母エキス 2.5g、ペプトン 5g、グルコース 1g、クリスタルバイオレット 0.001 g、トリフェニルテトラゾリウムクロライド（TTC） 0.05 g、寒天 15 g、蒸留水 1000 mL、pH 7.0）を、酵母の検出には YPD 変法寒天培地（グルコース 10 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、麦芽エキス 3 g、寒天 20 g、蒸留水 1000 mL、pH 6.2）を使用した。また、YPD 変法寒天培地には、細菌のコンタミネーションを抑制する目的で 100 mg/L クロラムフェニコール（Chloramphenicol）を加え、その他の培地には酵母や黴のコンタミを抑える目的で 10 mg/L シクロヘキシミド（Cycloheximide）を添加した。滅菌生理食塩水（0.8 % NaCl）にて段階希釈を行った発酵種サンプル 100 μ L を表面塗抹し、30 °C で 48 時間培養後、計測したコロニー数から 1 g 中に存在する生菌数を算出した。また、得られたデータについては、各生菌数の平均値と標準偏差を算出した。

第5項 菌種の同定方法

発酵種の作製工程における各日の生菌数を調べた培地の同一希釈のプレートから 4-50 菌株をランダムに釣菌し、コロニー形状、顕微鏡観察からグルーピングした上で、グラム陰性菌と乳酸菌と酵母の菌種同定を行った。グラム陰性菌

および乳酸菌の同定については FAST MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial PCR Kit & Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して 16S rDNA 部分配列を解析し、データベースにて相同性を検索して、帰属分類群を推定した。また真菌の同定は FAST MicroSEQ D2 LSU rDNA Fungal PCR Kit & Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して、D2 LSU rDNA 部分配列の相同性を評価することで同定を行った。寒天培地から供試菌体を釣菌し、PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を 100 μ L 入った 1.5 mL マイクロ遠心チューブに懸濁した。その後、ヒートブロックを使用して 100 °C で 10 分間加熱し、遠心分離 (8947 \times g、5 秒間) 後の上清を DNA 溶液とし、鋳型として PCR 反応に使用した。495 μ L の nuclease-free-water を 1.5 mL マイクロチューブに分注し、5 μ L の鋳型 DNA 溶液を加えて、希釈した。その後、15 μ L FAST PCR Master Mix と希釈した DNA 溶液 15 μ L を混合した後、サーマルサイクラー (Veriti 96 well Thermal Cycler、Thermo Fisher Scientific) にて PCR 反応を行った。FAST MicroSEQ 500 16S rDNA Bacterial PCR Kit の反応条件は初期熱変性 (95 °C、10 秒) 後に、変性 (95 °C、0 秒)、アニーリング (64 °C、15 秒) を各 30 サイクル繰り返し、ファイナル伸長 72 °C、1 分を行った後に 4 °C で保温した。FAST MicroSEQ D2 LSU rDNA Fungal PCR Kit の反応条件は初期熱変性 (95 °C、10 秒) 後に、変性 (95 °C、0 秒)、アニーリング (64 °C、15 秒) を各 35 サイクル繰り返し、ファイナル伸長 72 °C、1 分を行った後に 4 °C で保温した。PCR 産物の精製は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用して行った。13 μ L Forward Sequence Mix と 13 μ L Reverse Sequence Mix PCR にそれぞれ精製した反応液 7 μ L を混合し、サーマルサイクラー (Veriti 96 well Thermal Cycler、Thermo Fisher Scientific) にてシーケンスの反応を行った。シーケンス反応の条件は初期熱変性 (96 °C、1 分) 後、変性 (96 °C、10 秒)、アニーリング (50 °C、5 秒)、

伸長 (60 °C、1 分 15 秒) を各 25 サイクル繰り返し、ファイナルステップを 4 °C に設定した。反応後、Dye Ex 2.0 Spin Kit (QIAGEN) を用いて、Big Dye terminator を除去し、伸長産物の精製を行った。精製された伸長産物はキャピラリー電気泳動装置 (ABI PRISM、3130xl Genetic Analyzer、Thermo Fisher Scientific) に供試し、塩基配列を決定した。DNA 塩基配列決定には 3100/3130x 50cm Capillary Array と POP-6 (Thermo Fisher Scientific) のポリマーを使用し、電気泳動を行い、3130xl Data Collection software (Thermo Fisher Scientific) を使用して配列を決定した。得られた塩基配列は MicroSEQ ID Analysis Software Ver.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、菌種の相同性を解析し、相同性が 99 %以上の菌種を特定した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 各年の発酵種から分離したグラム陰性菌、乳酸菌、酵母の菌数

それぞれロットの異なる原料をもちいて作製した発酵種の発酵過程中に存在する微生物について、CVT 寒天培地、MRS 北原変法寒天培地、YPD 変法寒天培地の生菌数を測定した結果を Fig. 7 および Fig. 8 に示す。両試験区において発酵過程 Day 0 から Day 1 にかけては CVT 寒天培地で 10^8 - 10^9 CFU/g の生菌数が確認され、MRS 北原変法寒天培地で検出されてくる乳酸菌数 10^7 - 10^8 CFU/g に比べて多かった。次に Day 1 から Day 2 にかけては乳酸菌が 10^8 - 10^{10} CFU/g のレベルで検出され、Day 5 まで同レベルの生菌数で推移した。一方、YPD 寒天培地ではそれぞれ検出される日数とその菌数に違いが見られた。J-sourdough A については、酵母生菌数が Day 3 に 10^6 CFU/g に達し、その後、Day 5 までに 10^8 CFU/g レベルまで増加したのに対し、J-sourdough B では Day 2

の酵母生菌数は 10^3 CFU/g で、Day 5 までに 10^6 CFU/g レベルに達した。

第 2 項 各発酵種から分離した微生物の菌種同定

J-sourdough A から検出された微生物の菌種同定結果を Table 10 に示す。Day 0 の CVT 培地から検出されたグラム陰性菌は *Erwina* 属 2 菌種、*Pantoea* 属 1 菌種であったが、Day 1 においては、それらに加えて、*Citrobacter* 属 2 菌種、*Cronobacter* 属 1 菌種、*Enterobacter* 属 3 菌種、*Klebsiella* 属 2 菌種、*Pseudomonas* 属 3 菌種が検出された。菌種としては、*Pantoea agglomerans* や *Erwina mallotibora* といった腸内細菌科細菌が多い傾向が認められたが、その割合はそれぞれ 20% と 17% であり、Day 0 から Day 1 にかけて、検出される菌種が増える傾向が認められた。一方、MRS 北原変法寒天培地を用いて検出された乳酸菌としては、Day 1 において *Pediococcus* 属 4 菌種が同定され、その中でも *Pediococcus pentosaceus* は乳酸菌中で約 30% を占め、Day 5 までその比率が維持された。一方、Day 1 から *Staphylococcus* 属 2 菌種が検出されたが、その後の工程では検出されなかった。

Day 2 から Day 5 にかけて、*Enterococcus* 属 3 菌種、*Lactococcus* 属 1 菌種、*Lactobacillus* 属 3 菌種、*Weisselia* 属が少数検出されたが、発酵種作製工程を通して検出された菌種は *Pediococcus pentosaceus*、*Pediococcus stilesii*、*Pediococcus claussenii* といずれも *Pediococcus* 属であった。次に酵母については Day 3 で *Candida castellii*、*Candida glabrata*、*Kazachstania viticola*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Wickerhamomyces anomalus* が検出され、Day 4 で *Vanderwaltozyma polyspora* が検出されたが、Day 5 まで検出された菌種は *Saccharomyces cerevisiae* であり、酵母の菌叢の中で約 79% と優勢を占めていた。

次に J-sourdough B について、菌種同定した結果を Table 11 に示す。Day 0 の CVT 培地から検出されたグラム陰性菌は *Citrobacter koseri*、*Erwinia aphidicola*、

Pantoea vagans の 3 菌種であり、Day 1 では *Pantoea vagans*、*Kosakonia cowanii* の 2 菌種が同定され、J-sourdough A と同様に腸内細菌科細菌が中心であった。また、Day 0 から Day 1 にかけて、菌種の数が増えることはなく、特に *Kosakonia cowanii* が優占種であった。一方、MRS 北原変法寒天培地で検出された乳酸菌については、Day 1 において *Pediococcus pentosaceus* と *Weisselia confusa* が検出された。Day 2 以降に *Enterococcus faecium*、*Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum* が検出され、Day 3 以降に *Weisselia confusa* が減少する傾向を示し、Day 3 から Day 5 にかけて検出された乳酸菌種は *Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum* の 3 菌種であった。次に酵母については Day 2 で *Pichia kudriavzevii* が検出され、Day 3 から Day 4 にかけて、*Pichia kudriavzevii* と *Wickerhamomyces anomalus*、Day 5 で *Rhodotorula mucilaginosa*、*Saccharomyces cerevisiae* が検出された。その中でも *Pichia kudriavzevii* は Day 2 から Day 5 にかけて常に検出され、検出される酵母の 70% を占めていた。

第 4 節 考察

本章では 2 年にかけて同じ原料のライ麦粉、小麦粉の異なるロットを使用して、発酵種を作成したが、使用した原料のロットの違いにより酵母が検出されるタイミングや菌数に違いが見られた。また、その菌叢を解析した結果、腸内細菌科細菌である *Pantoea* 属、*Erwinia* 属、*Kosakonia* 属を中心に多様な菌種が検出されたものの、乳酸菌については、両年ともに *Pediococcus pentosaceus* をはじめとする *Pediococcus* 属や *Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum* といった *Lactobacillus* 属が高頻度で検出された。

Pediococcus pentosaceus が主要な乳酸菌種として存在している原因として、本菌の資化する糖の種類がグルコース、フルクトース、マルトース、スクロースなど多様であるため生育速度が速く、乳酸の生成も速いことが知られている (Corsetti A ら、2017 年)。また、*Lactobacillus fermentum* や *Lactobacillus plantarum* も糖の資化能が高く、これが発酵の後半で検出された要因であると考えられた。尚、ベーカリーで検出され、発酵種中でもっとも報告が多い *Lactobacillus sanfranciscensis* は本研究では検出されなかった。*Lactobacillus sanfranciscensis* は資化できる糖の種類がマルトースとグルコースの 2 種類と少なく、生育速度も他の菌種と比べて遅い (Corsetti A ら、2017 年)。そのため *Pediococcus pentosaceus* や *Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum* が優勢に生育し、種継期間が 5 日間と比較的短い本試験では *Lactobacillus sanfranciscensis* が十分に生育できずに検出されなかったのではないかと考えられた。また、16SrRNA 遺伝子配列に基づく *Lactobacillus* 属の進化系統樹 (岡田ら、2010 年) の中で *Lactobacillus sanfranciscensis* と系統や形質が極めて近い *Lactobacillus fructivorans* について、中山らは世代時間が長く、酢酸の取りこみが悪いため、高い酢酸耐性を示すと報告している (中山ら、2013 年)。今回、第 2 章で取り上げたベーカリーで製造されている発酵種の中でも *Lactobacillus sanfranciscensis* は、28°C で 24 時間と最も発酵時間が長いベーカリー C の発酵種でのみ検出された。これは発酵種中の乳酸菌体や酵母菌体がより長い時間にわたり、乳酸や酢酸のような有機酸を含む低 pH の環境に晒されることになるため、数年間にわたり繰り返し、種継ぎが行われる発酵種の過程で菌体内への取り込みの影響を受けにくい *Lactobacillus sanfranciscensis* が優勢になっていったと推察された。

一方、酵母については発酵種を作製したロットによって主要な菌種が異なっており、J-sourdough A では *Saccharomyces cerevisiae* であったが、J-sourdough B

では *Pichia kudriavzevii* が主要な菌種として検出された。*Pichia kudriavzevii* はドイツの小麦、ライ麦、粟、米などを原料にした発酵種から検出例があり

(Vogelmann ら、2009年)、マルトースは資化せず、グルコースのみを代謝し、エタノールやグリセロール、乳酸などを利用することは知られているが、発酵種の発酵中における役割や重要性はまだよく知られていない(De Vuyst ら、2016年; Greppi ら、2015年)。また、*Wickerhamomyces anomalus* については、資化する糖や窒素源が限定的である他、低水分活性、pH、浸透圧などのストレスに対する耐性が高く、発酵種中では特異な存在(Daniel ら、2011年)であるが、ベルギー、フィンランド、フランスなどのライ麦や小麦を使った発酵種からの検出例がある(Daniel ら、2011年; De Vuyst ら、2016年; Vrancken ら、2010年)。

一般にベーカリーで製造される発酵種の酵母としては *Saccharomyces cerevisiae* が主要な菌種であったが、本研究では、*Saccharomyces* 属以外の多様な酵母菌種が検出された。この理由として発酵種を作製している環境が異なっことが考えられる。一般的に日本のベーカリーではパン生地を製造する際に工業用のパン酵母が用いられるが、無菌的に作業しているわけではない為、作業環境や機器などに多くの *Saccharomyces cerevisiae* が付着しており、発酵種のコンタミネーションを起こしやすいことが考えられる。一方、本研究は無菌の環境で発酵種を調製しているため、原料として用いたライ麦粉や小麦粉に本来付着していた酵母のうち、発酵条件に適した多様な酵母菌種が生育し、検出されたと考えられた。

第5節 小括

発酵種の製法の中でも代表的な製法として、ライ麦粉、小麦粉、モルトエキスや水などを用い6日間かけて乳酸菌や酵母を自然発酵させる製法がある。一般的に乳酸菌や酵母についての存在は数多く報告されているものの、日本国内で製造される伝統的な発酵種の発酵過程で出現する微生物の挙動や菌種についての詳細な報告は少ない。第3章では原料に使用するライ麦粉や小麦粉の原産地を変えた場合に微生物挙動や成分挙動の違いを評価した。本章では2012年から2013年にかけて同じ原料であるものの、ライ麦粉と小麦粉が異なるロットを使用して調製した伝統的な発酵種作製工程における微生物の挙動を比較検討した。さらにCVT培地、MRS北原変法培地で検出された細菌については16S rDNAの塩基配列解析により同定し、YPD変法培地から検出された真菌についてはD2 LSU rDNA配列の塩基配列解析により同定した。その結果、発酵1日目ではライ麦粉の常在菌である *Pantoea* 属、*Erwinia* 属の腸内細菌科細菌が高頻度に検出され、同時に *Pediococcus* 属の乳酸菌が検出される傾向が見られた。発酵2日目以降には、*Pediococcus* 属、*Lactobacillus* 属の乳酸菌が多く検出された。その中でも *Pediococcus pentosaceus* はもっとも検出頻度が高かった。また、発酵3日目以降には *Saccharomyces* 属、*Pichia* 属、*Candida* 属など多様な酵母菌種が高い頻度で検出された。発酵種において代表的な乳酸菌のひとつとされている *Lactobacillus sanfranciscensis* は本研究では検出されなかった。

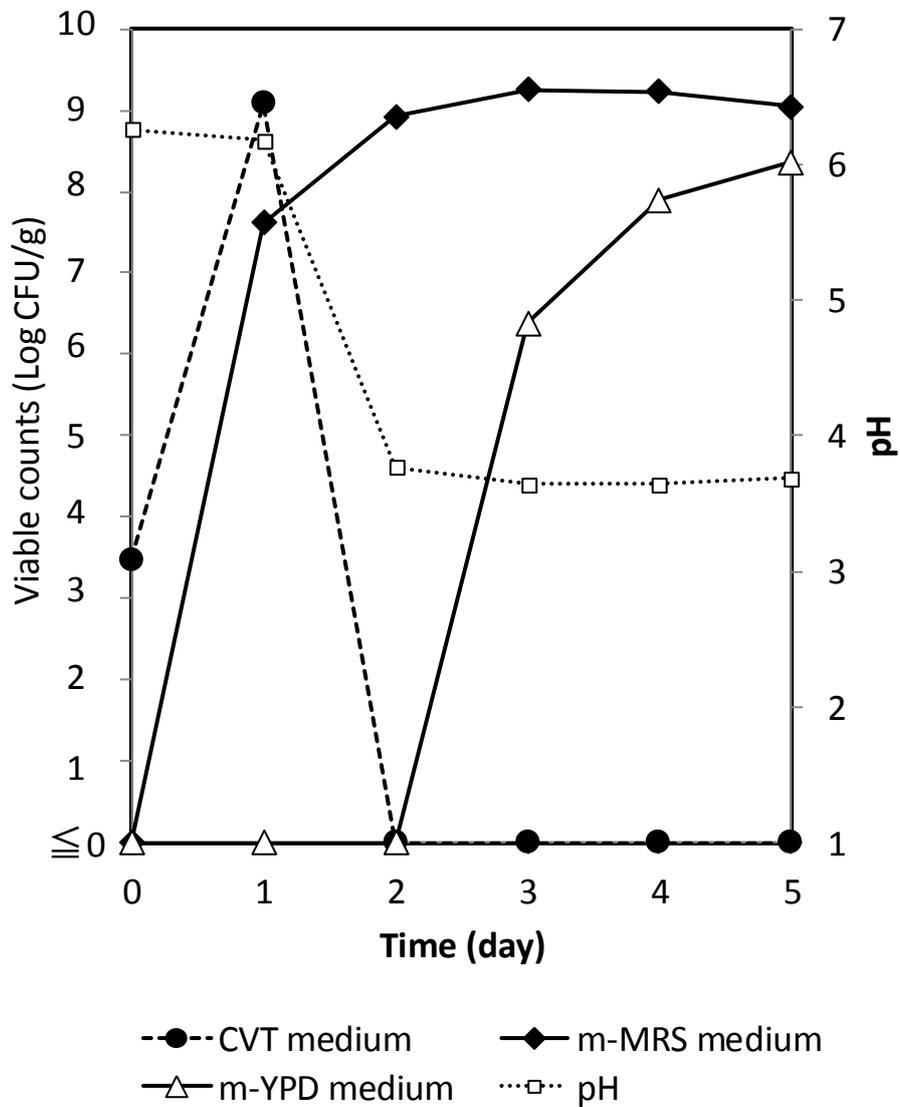


Fig. 7. Microbial behavior during J-sourdough A production process.

The combination of flour material: rye flour J and wheat flour J purchased in 2012

Sampling method: On day 0, sampling was performed immediately after mixing the ingredients.

Day 1 onwards, sampling and evaluation were performed immediately after fermentation.

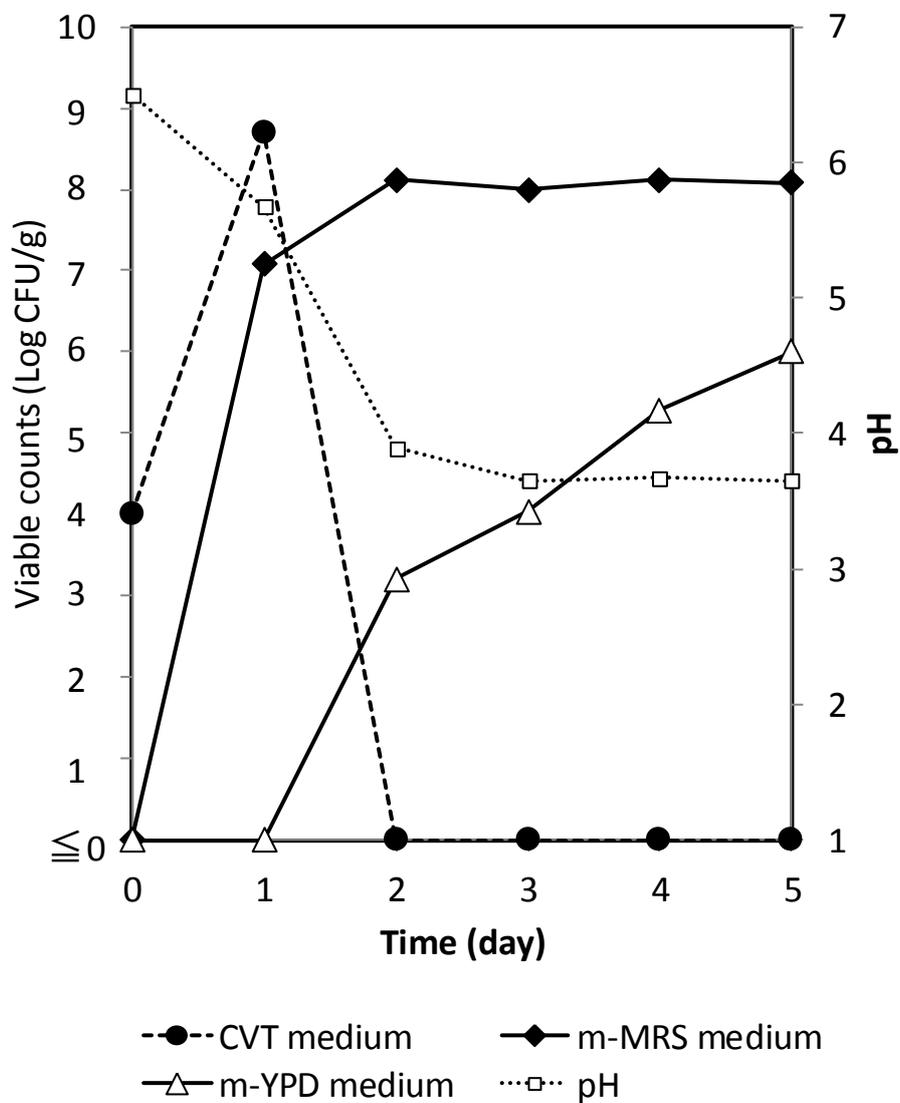


Fig. 8. Microbial behavior during J-sourdough B preparation process.

The combination of flour material: rye flour J and wheat flour J purchased in 2013

Sampling method: On day 0, sampling was performed immediately after mixing the ingredients.

Day 1 onwards, sampling and evaluation were performed immediately after fermentation.

Table 10. Changes of microflora in J-sourdough A during production process

	Strain	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Gram negative	<i>Erwinia mallotibora</i>	5	6	-	-	-	-
	<i>Erwinia papayae</i>	5	4	-	-	-	-
	<i>Pantoea agglomerans</i>	5	7	-	-	-	-
	<i>Citrobacter rodentium</i>	-	5	-	-	-	-
	<i>Citrobacter youngae</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Cronobacter muytjensii</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Enterobacter cowanii</i>	-	4	-	-	-	-
	<i>Enterobacter kobei</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Klebsiella variicola</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas lurida</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas poae</i>	-	1	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas trivialis</i>	-	1	-	-	-	-
	total	15	35	0	0	0	0
Lactic acid bacteria	<i>Enterococcus hirae</i>	-	-	1	-	-	-
	<i>Enterococcus ratti</i>	-	-	1	1	-	-
	<i>Enterococcus villorum</i>	-	-	1	1	-	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	1	-	-	-
	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	-	-	-	1	-	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	1	1	4
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	-	-	-	1	-	-
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	4	-	4	-	-
	<i>Pediococcus clausenii</i>	-	4	6	5	8	6
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	13	18	12	11	12
	<i>Pediococcus stilesii</i>	-	7	11	9	10	8
	<i>Staphylococcus equorum</i>	-	8	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus succinus</i>	-	4	-	-	-	-
	<i>Weisselia confusa</i>	-	-	1	-	-	-
	total	0	40	37	33	30	30
Yeast	<i>Candida castellii</i>	-	-	-	2	-	-
	<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	10	-	5
	<i>Kazachstania viticola</i>	-	-	-	2	-	2
	<i>Kluyveromyces delphensis</i>	-	-	-	-	-	1
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	10	20	34
	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	-	-	-	-	4	1
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	2	-	-
	total	0	0	0	24	24	43

Table 11. Changes of microflora in J-sourdough B during production process

	Species	Number of isolates					
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
Gram negative bacteria	<i>Citrobacter koseri</i>	7	-	-	-	-	-
	<i>Erwinia aphidicola</i>	7	-	-	-	-	-
	<i>Pantoea vagans</i>	14	8	-	-	-	-
	<i>Kosakonia cowanii</i>	-	14	-	-	-	-
	Total number of isolates	28	22	0	0	0	0
Lactic acid bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	4	-	-	-
	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-	6	-	-
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	4	5	12	12
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	14	20	28
	<i>Lactobacillus sakei</i>	-	-	4	-	-	-
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	6	12	14	12	10
	<i>Weisselia confusa</i>	-	12	4	-	-	-
Total number of isolates	0	18	28	39	44	50	
Yeast	<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	4	24	21	24
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	4
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	6
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	12	9	-
	Total number of isolates	0	0	4	36	30	34

第5章 総括

日本国内のパン製造業においては、コンビニエンスストアやカフェ業界の発展と共に、消費者の要求が日々変化すると共に、さらなるおいしさ、健康志向といった付加価値が常に求められるため、その手段の一つとして発酵種の活用が拡大しつつある。発酵種はライ麦や小麦粉を用いて、種継ぎという自然発酵を繰り返し行うことで、原料由来の大腸菌群細菌がまず増殖してタンパク質や多糖などの分解を行い、これに少し遅れて生育する乳酸菌による有機酸の生成により大腸菌群の生育を強く抑制する。最終的に乳酸菌と酵母が発酵の主体となる発酵種が調製される。原料の配合、温度や期間などの発酵条件や原料や製造環境に存在する微生物叢については、これまでもヨーロッパを中心に海外から様々な情報が日本に入ってきており、パン製造業において発酵種のモデルとなっている。しかし、日本とヨーロッパではパンを作る際に使用される小麦粉の品質は異なっている。特にヨーロッパでは小麦の品種以外に小麦粉に含まれる灰分量を基準に分類する傾向があるが、日本ではグルテンの麩質、タンパク質量や灰分が重視され、麩質やタンパク質量で強力粉、中力粉、薄力粉というように分類され、灰分量により強力粉は1等粉、2等粉のように分類される。つまり、ヨーロッパの発酵種に関する情報に基づいて発酵種を調製したとしても、日本で流通している穀物粉を使用した場合には、発酵種の品質はヨーロッパのものとは異なることが考えられる。一方で、日本国内のリテールベーカーではパンの食感や風味の品質を向上する目的で自ら発酵種を製造して使うケースが増えているものの、その発酵種の調製は製造者の経験に依存しており、発酵種中に存在する微生物叢、食品成分などの詳細な情報は知られていなかった。また、発酵種を製造する際の品質が変化しやすく、発酵の安定性に欠くこ

とが課題であった。

そこで本研究では関西地区のベーカリー4店舗で種継がれ、使用されている発酵種を入手し、乳酸菌、酵母について菌種同定を行い、次に発酵種の有機酸、糖、遊離アミノ酸、香气成分をはじめとする食品成分の特徴について評価を行った。また、各店舗の発酵種を生地に10%添加して作製したバケットの官能評価の結果から各店舗の発酵種がパンの品質に与える影響について検討を行った。その結果、乳酸菌については、4店舗ごとに発酵種から検出される乳酸菌種が異なり、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus alimentarius*、*Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus vaccinoferus*、*Lactobacillus sanfranciscensis*、*Lactobacillus sakei* が検出された。また、4店舗の発酵種から検出された主要な酵母はいずれも *Saccharomyces cerevisiae* であり、一部の店舗で *Candida humilis* が検出された。4店舗の発酵種の食品成分については乳酸、酢酸、マルトース、グルコース、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン、アルギニン、GABA、トリプトファンといった食品成分の含量に違いがみられ、香气成分としては、エタノール、3-メチル-ブタノール、フェネチルアルコールといったアルコール類や酢酸エチル、乳酸エチルのようなエステル類の含量に違いがみられた。各店舗の発酵種を使用して焼成したバケットについて官能評価を実施した結果、風味、食感がそれぞれ異なっており、特に香ばしい香りの強さや質は、4店舗ごとに異なった。香ばしい香りは遊離アミノ酸と糖によるメイラード反応により生成することが知られているため、乳酸菌種や乳酸菌数と酵母菌数の比率が発酵種の遊離アミノ酸や糖、有機酸といった食品成分の含量に影響し、最終的に焼成後のパンの香ばしい香りの質に影響している可能性が考えられた。これは各リテイルベーカリーでつくられる発酵種やそれらを使用したパンの特長が異なることを裏付ける結果であり、リテイルベーカリーにとって消費者にアピー

ルする製品の差別化につながっていることが考えられた。

次に多くの日本のベーカリーで利用されているライ麦粉、小麦粉、モルトエキス、水などを混合して6日間かけて自然発酵させる発酵種製法により、日本とフランスで製粉拠点の異なるライ麦粉と小麦粉を使用して作製した発酵種の作製工程における食品成分の変化と微生物の挙動について比較検討を行った。

食品成分については、有機酸、糖、遊離アミノ酸の変化を、微生物の挙動についてはCVT培地、BCP培地、MRS変法培地、YPD変法培地で検出される生菌数変化を6日間調べた。その結果、タイプの異なる発酵種はいずれも発酵2日目には乳酸量が大きく増加し、発酵4日目以降には遊離アミノ酸量が減少する傾向を示した。特にフランスで製粉した原料を使った発酵種は全体的に生成する乳酸量が少なく、グルコース、スクロースを中心に糖量の変動が少なかった。

また、日本で製粉された原料を使った発酵種の糖量は発酵1日目でグルコース、マルトースを中心に減少し、2日目以降に増加したものの、発酵5日目にかけて緩やかに減少する傾向が見られた。一方、微生物については使用した原料の種類に関わらず、発酵2日目にはBCP培地およびMRS変法培地で検出される乳酸菌が優勢になった。また、酵母についてはフランスで製粉された原料を用いた場合には3日目までは酵母が検出されない場合もあった。日本で製粉された原料を用いた場合には発酵3日目から酵母が検出され、作製したロットによる酵母菌数の変化に大きな違いは認められなかった。発酵種の香气成分としては、フランスで製粉された原料で調製した発酵種からは酸類が多く検出されたのに対して、日本で製粉された原料による発酵種ではエステル類やアルコール類が多く検出され、発酵種の品質として好ましいものであった。これは使用するライ麦粉や小麦粉の品質が発酵種の品質に影響を与えることを示している

が、日本国内の製パンメーカーおよびリテールベーカリーでは、多種多様なライ麦粉、小麦粉が使用されている。使用するライ麦粉や小麦粉が異なれば、酵母の増殖が異なり、出来上がる発酵種の品質も変わる可能性が示されたため、発酵種に使用する原料は注意深く選択する必要があると考えられた。

さらに2012年から2013年にかけて、ロットの異なるライ麦粉および小麦粉を用いて、無菌的に調製した伝統的な発酵種製造工程中にCVT培地、MRS北原変法培地、YPD変法培地で微生物の検出を行い、菌種の同定を行った。特にCVT培地、MRS北原変法培地で検出された細菌については16S rDNAの塩基配列解析により同定し、YPD変法培地から検出された真菌についてはD2 LSU rDNAの塩基配列解析により同定した。その結果、発酵1日目ではライ麦粉の常在菌である *Pantoea* 属、 *Erwinia* 属の腸内細菌科細菌が高頻度に検出され、同時に *Pediococcus* 属の乳酸菌も検出された。発酵2日目以降には、 *Pediococcus* 属、 *Lactobacillus* 属の乳酸菌が多く検出された。その中でも *Pediococcus pentosaceus* はもっとも検出頻度が高かった。また、発酵3日目以降には *Saccharomyces* 属、 *Pichia* 属、 *Candida* 属といった多様な酵母菌種が検出された。発酵種において代表的な乳酸菌のひとつとされている *Lactobacillus sanfranciscensis* は本調製過程からは検出されなかった。

本結果から同じ商品のライ麦粉や小麦粉の原料を用いれば、発酵種作製工程における乳酸菌や酵母の挙動は類似するものの、原料ロットによって菌叢は異なる可能性があることを示している。発酵種中の乳酸菌や酵母の種類が異なった場合には、発酵種の食品成分が大きく変化するため、これを使用して製造したパンの品質も異なり、最終的にパンの品質の安定性にも影響を及ぼすリスクが考えられた。

また、第3章と第4章で用いた発酵種作製工程はパンへ使用できる最短日数

の6日間に設定し、評価を行った。本研究では6日以降の種継ぎの評価は実施していないが、乳酸菌や酵母菌数が一定菌数存在した発酵種を使用して、種継ぎを繰り返した場合には、栄養分の資化性から発酵種中の乳酸菌や酵母の種類が安定してくるのではないかと考えられる。

本研究の結果から自然発酵にて行う発酵種の作製において同一の原料を用いる場合には作製過程における乳酸菌や酵母の菌数の変化は比較的再現性が高いが、乳酸菌種や酵母菌種の再現性の確保は困難であることが示された。また、日本国内のベーカリーで製造されている発酵種についての詳細な解析が行われていなかったことから、本研究では菌叢解析や成分分析を行って発酵種を評価したが、日々の検査における菌叢解析や成分分析は、時間やコストがかかることから困難である。さらに一定量のパンを製造することが求められるパン製造業では、パン製造の合間の限られた時間で発酵種の調製を行わざるを得ないケースも多い。しかし、安全で安定した品質の発酵種を製造するためには発酵させる際の容量、発酵温度や発酵時間などの発酵条件、使用する原料の種類やロットについて細心の注意を払い、出来上がった発酵種のpHや日々の微妙な香りや味の違いを確認する必要がある。それができない場合は、市販の発酵種もしくは発酵風味料を利用することや、自然発酵させた発酵種の品質安定性を高める手法として、市販されている乳酸菌スターターやパン酵母を併用することで解決することが望まれる。今後、さらに種々の発酵種の微生物叢の同定と発酵工程中の変化、これに伴う食品成分の変化を詳細に解析することにより、より安全で高品質なパン製造に資する発酵種の開発が可能になると期待される。

参考文献

1. Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., and Dal Bello, F. (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, **24**, 165–174.
2. Bleukx, W., Brijs, K., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Delcour, J. (1998) Specificity of a wheat gluten aspartic proteinase. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1387**, 317–324.
3. Chavan, R.S. and Chavan, S.R. (2011) Sourdough technology-a traditional way for wholesome foods; a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10**, 170–183.
4. Corona, O., Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Nasca, A., Francesca, N., Martorana, A., Moschetti, G., and Settanni, L. (2016) Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiology*, **59**, 43–56.
5. Corsetti, A, Settanni L, Valmorri S, Mastrangelo M, Suzzi G. (2007) Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiology*, **24**, 592-600.
6. Corsetti, A. and Settanni, L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, **40**, 539–558.
7. Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., and Gobbetti, M. (2001) Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, **64**, 95–104.
8. Corsetti, A., Settanni, L., Lopez, C.C., Felis, G.E., Mastrangelo, M., and Suzzi, G.

- (2007) A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *Systematic and Applied Microbiology*, **30**, 561–571.
9. Daniel, H.M., Moons, M.C., Huret, S., Vrancken, G., De Vuyst, L. (2011) *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**, 63-73.
 10. De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., and Leroy, F. (2016) Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology*, **239**, 26–34.
 11. De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. (2014) Microbial ecology of sourdough fermentations; diverse or uniform? *Food Microbiology*, **37**, 11-29.
 12. De Vuyst, L. and Neysens, P. (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, **16**, 43–56.
 13. De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., and Weckx, S. (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology*, **26**, 666–675.
 14. Ercolini, D., Pontonio, E., De Filippis, F., Minervini, F., La Stora, A., Gobbetti, M., and Di Cagno, R. (2013) Microbial ecology dynamics during rye and wheat sourdough preparation. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 7827–7836.
 15. Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., and Schrader, J. (2002) Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 1–8.

16. Ferchichi, M., Valcheva, R., Pre´vost, H., Onno, B., and Dousset, X. (2007) Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, **24**, 678–686.
17. Fujimoto, A., Ito, K., Itou, M., Narushima, N., Ito, T., Yamamoto, A., Hirayama, S., Furukawa, S., Morinaga, Y., and Miyamoto, T. (2018) Microbial behavior and changes in food constituents during fermentation of Japanese sourdoughs with different rye and wheat starting materials., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **125**, 97–104.
18. Gänzle, M.G., Ehrmann, M. and Hammes, W.P. (1998) Modelling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **18**, 277–285.
19. Gänzle, M.G., Loponen, J., and Gobbetti, M. (2008) Proteolysis in sourdough fermentations; mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 513–521.
20. Gänzle, M.G. (2014) Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, **37**, 2–10.
21. Gobbetti, M., Corsetti, A., and Rossi, J. (1994) The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts; metabolism of amino acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 456–460.
22. Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2016) Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology*, **239**, 3–18.

23. Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., and De Angelis, M. (2014) How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, **37**, 30–40.
24. Greppi A., Krych L., Costantini A., Rantsiou K., Hounhouigan D.J., Arneborg N., Cocolin L., Jespersen L., (2015) Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPK gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *International Journal of Food Microbiology*, **205**, 81-89.
25. Guirard, B.(1974) “Handbook of Microbiology, vol. 4.” (Ed.) Laskin, A. I. and Lechevalier, H.A., CRC Press, Cleveland, p.1.
26. Hansen, A. and Schieberle, P. (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation; applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology*, **16**, 85–94.
27. Harth, H., Van Kerrebroeck, S., and De Vuyst, L. (2016) Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions. *International Journal of Food Microbiology*, **228**, 22-32.
28. Infantes, L., Tourneur, C. (1991) Survey on the lactic flora of natural sourdoughs located in various French areas. *Sciences des Aliments*, **11**, 527-545.
29. Katina, K., Kaisa, P., and Karin, A. (2004) Influence and interactions of processing conditions and starter culture on formation of acids, volatile compounds, and amino acids in wheat sourdoughs., *Cereal Chemistry*, **81**, 598–610.
30. Kitahara M, Sakata S, Benno Y. (2005) Biodiversity of *Lactobacillus*

- sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. Letters in Applied Microbiology, **40**, 353–357.
31. Kitahara, K., Kaneko, T., and Goto, O. (1957) Taxonomic studies on the hiochi-bacteria, specific saprophytes of sake. 1. Isolation and grouping of bacterial strains, The Journal of General and Applied Microbiology, **3**, 102–110.
 32. Kline L., Sugihara T.F. (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. Applied and Environmental Microbiology, **21**, 459-465.
 33. Lacaze G., Wick M., Cappelle S. (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. Food Microbiology, **24**, 155–160.
 34. Lhomme, E., Lattanzi, A., Dousset, X., Minervini, F., De Angelis, M., Lacaze, G., Onno, B., and Gobbetti, M. (2015) Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs, International Journal of Food Microbiology, **215**, 161–170.
 35. Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2014) Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. International Journal of Food Microbiology, **171**, 136–146.
 36. Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., and Gobbetti, M. (2012) Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads; interactions between ingredients and microbial species diversity. Applied and Environmental Microbiology, **78**, 1251–1264.
 37. Okada, S., Suzuki, Y., and Kozaki, M. (1979) A new heterofermentative

- lactobacillus species with meso-diaminopimelic acid in peptidoglycan, *Lactobacillus vaccinoferus* KOZAKI and OKADA sp. nov., The Journal of General and Applied Microbiology, **25**, 215–221.
38. Onno, B. and Roussel, P. (1994) Technologie et microbiologie de la panification au levain. In; De Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), Bacteries Lactiques. Lorica, 11. Uriage, France, pp.293–320
39. Pico, J., Bernal, J. and Gomez, M. (2015) Wheat bread aroma compounds in crumb and crust; A review. Food Research International, **75**, 200–215.
40. Ravyts, F. and De Vuyst, L. (2011) Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. Food Microbiology, **28**, 1129–1139.
41. Ripari, V., Cecchi, T., and Berardi, E. (2016) Microbiological characterisation and volatiles profile of model, ex-novo, and traditional Italian white wheat sourdoughs. Food Chemistry, **205**, 297–307.
42. Rühmkorf, C., Jungkuntz, S., Wagner, M., and Vogel, R.F. (2012) Optimization of homoexopolysaccharide formation by lactobacilli in gluten-free sourdoughs. Food Microbiology, **32**, 286–294.
43. Stolz, P., Böcker, G., Vogel, F.R., and Hammes, P.W. (1993) Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough., FEMS Microbiology Letters, **109**, 237–242.
44. Stone, H. and Sidel, J. (2004) Sensory Evaluation Practices, 3rd ed., Elsevier Academic Press, California.
45. Sugihara, T. F., Kline, L., Miller, M. W. (1971) Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process I. Yeasts responsible for the leavening

- action. *Applied and Environmental Microbiology*, **21**, 456-458.
46. Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G. (2007) Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6262-6269.
47. Takahashi, K., Tsuchiya, F., and Isogai, A. (2014) Relationship between medium-chain fatty acid contents and organoleptic properties of Japanese sake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 8478–8485.
48. Tanasupawat, S. and Komagata, K. (1995) Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **11**, 253–256.
49. Tang, K.X., Zhao, C.J., and Gänzle, M.G. (2017) Effect of glutathione on the taste and texture of type I sourdough bread., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**, 4321–4328.
50. Thiele, C., Gänzle, M., and Vogel, R. (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chemistry*, **79**, 45–51.
51. Thiele, C., Grassl, S., and Ganzle, M. (2004) Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1307–1314.
52. Tukey, J. (1949) Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, **5**, 99-114.
53. Uno, K., Imai, T., Ogata, N., and Kohyama, K. (1996) New viscograph for rheological analysis of a small quantity of wheat flour. *Cereal Chemistry*, **73**,

452–456.

54. Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst L (2007) Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4741-4750.
55. Veraverbeke, W.S. and Delcour, J.A. (2002) Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**, 179–208.
56. Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R.A., Stendel, U., Gänzle, M.G. and Ehmann, M.A. (1999) Non - dairy lactic fermentation: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76**, 403-411.
57. Vogelmann S.A., Seitter M., Singer U., Brandt M.J., Hertel C. (2009) Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters., *International Journal of Food Microbiology*, **130**, 205-212
58. Vogelmann, S.A. and Hertel, C. (2011) Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiology*, **28**, 583–589.
59. Vrancken G., De Vuyst L., Van der Meulen R., Huys G., Vandamme P., Daniel H.M. (2010) Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs., *FEMS Yeast Research*, **10**, 471-481.
60. Weckx, S., Allemeersch, J., Van der Meulen, R., Vrancken, G., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., and De Vuyst, L. (2011) Metatranscriptome analysis for insight into whole ecosystem gene expression during spontaneous

- wheat and spelt sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 618–626.
61. Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., and De Vuyst, L. (2010-a) Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology*, **27**, 1000–1008.
62. Weckx, S., Van der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., and De Vuyst, L. (2010-b) Community dynamics of sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 5402–5408.
63. Yoshihashi T, Huong NT, Inatomi H. (2002) Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavor compound of an aromatic rice variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2001-2004.
64. 旭屋出版編集部編 (2002) 人気店の天然酵母パンの技術,株式会社旭屋出版, pp.5-13.
65. 井上好文 (2007) 天然酵母の表示問題に関する見解, 社団法人日本パン技術研究所, pp.14-24.
66. 越後和義 (1976) パンの研究 文化史から製法まで, 柴田書店 (東京), pp.10-45.
67. 岡田早苗, 柳田藤寿, 鈴木健一郎, 飯野隆夫, 石川森夫, 渡辺幸一, 藤澤倫彦, 陳奕伸, 宮下美香 (2010) 第1章 乳酸菌の定義と分類・同定, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 日本乳酸菌学会, 京都大学学術出版会 (京都) pp38-39.
68. 河合弘康 (1996) 日本のパン種—酒種-の起源とその発酵特性, 日本醸造学

- 会誌, 91, (5), 311-317.
69. 川戸高博, 藤本章人, 井藤隆之(2012) 低温長時間熟成に着目した発酵風味料 (ポルテ冷熟種)の開発について,日本イースト工業会技術報告, **82**, 11-14.
70. 志賀勝栄 (2007)「酵母から考えるパンづくり」, 柴田書店, pp.14-21.
71. 総務省統計局 (2011) 家計ミニトピックス, 主食への支出 -家計調査(二人以上の世帯) 結果より-, 家計調査通信 447 号, 平成 23 年 5 月 15 日発行.
72. 総務省統計局 (2018) 穀類, 家計調査 (二人以上) の世帯品目別都道府県庁所在市及び政令指定都市ランキング, 家計調査統計データ.
73. 竹葉洋 (1986) 伝統的“種”の解明による「パンの風味」の改良, 食品と開発, **21**, 25-29
74. 中村敏英 (2016) 酵母を操る乳酸菌: サワー種乳酸菌の多様性, 日本乳酸菌学会誌, **27**, 53
75. 中山素一, 細谷幸一, 朱丹, 佐藤豊樹, 畑朋美, 宮本敬久 (2013) 低酸、低塩ドレッシングにおける *Lactobacillus fructivorans* の制御, 日本食品科学工学会誌, **60**, 165-172.
76. 藤本章人, 井藤隆之, 井村聡明 (2012) 伝統的パン種のおいしさと微生物の関わりについて, 日本生物工学会誌, **6**, 329-334.
77. 藤本章人, 須藤昌子 (2010) 製菓・製パン用発酵風味料「サワード」シリーズ. 食品と科学, **52**, 80-88.
78. 藤本章人 (2017) 西洋の食文化と微生物 身近で活躍する有用微生物「パンと微生物」, モダンメディア, **63**, 186-192.
79. 日清製品株式会社, オリエンタル酵母工業株式会社, 宝酒造株式会社 (1985) パンの原点ー発酵と種ー, 日清製粉株式会社 (東京), pp11-15.

80. 富士経済東京マーケティング本部 (2017) 「新・パン市場のチャネル別需要分析調査 2017」, 株式会社富士経済
81. 矢野経済研究所編集部 (2013) 2013 年度版 冷凍パン生地と冷凍パンの市場実態と展望, 株式会社矢野経済研究所

謝辞

本研究は私が MC フードスペシャリティーズ株式会社 研究開発統括本部 製品開発研究所において進めてきた一連の研究のうち、製パン用発酵種に関する基礎的研究について得られた知見をもとに、九州大学大学院 生物資源環境科学府博士後期課程における学位論文研究として行われたものである。本研究の実施と論文執筆にあたり終始御懇切な御指導、ご鞭撻を賜りました九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門 食糧化学工学講座 食品衛生化学研究室 宮本敬久教授に心より感謝いたします。また、本研究をまとめるに当たり、貴重な御助言と御校閲を賜りました、同大学院食品衛生化学研究室 本城賢一准教授、また、同大学院 食品製造工学研究室 井倉則之准教授に厚く感謝の意を表します。さらに 2010 年から発酵種の研究を進めるに際し、終始御懇篤なる御協力、御助言、御鞭撻を賜りました日本大学 生物資源科学部 食品科学工学科 食品微生物研究室 元教授 森永康博士ならびに元准教授 故 古川壮一博士に深く感謝いたします。本研究を行うにあたり、博士後期課程の編入学の機会を与えてくださいました MC フードスペシャリティーズ株式会社 元研究開発統括本部長 江木衷様、元食品開発研究所所長 井村聡明様、元食品開発研究所製品開発センター長 小笠原正志様、製品開発研究所所長 宗哲治様に深く感謝いたします。

MC フードスペシャリティーズ株式会社製品開発研究所ならびに日本大学 生物資源科学部食品工学科食品微生物研究室に在籍された皆様に実験に協力していただいたことに対し、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に本大学院にて本研究を進めるためには、家族の深い理解と協力がなくては成し遂げられませんでした。心より感謝いたします。