

製パンにおける酪酸臭発生要因の解明

Investigation of factors causing butyric acid off-flavor
in a fermentation process of the bread making

東 孝 憲

北海道立総合研究機構 食品加工研究センター
(現：北海道立総合研究機構 水産研究本部)

【研究目的】

消費者の食の安全に対する関心の高まりを反映して、食品に関する苦情件数は高い値を示している¹⁾。食品への苦情事例の中で、食品の異味・異臭に関する苦情は、消費者が不快感、不信感を訴える頻度が高いことから、製造企業では異味・異臭の発生防止への取り組みが喫緊の課題となっている。パンの異臭は、真菌によるシンナー臭^{2, 3)}や *Bacillus* 属菌による果実様臭⁴⁾などが報告されている。一方、チーズや袋詰め農産物加工品では、偏性嫌気性芽胞形成菌である *Clostridium* 属菌が製品中で酪酸を産生し、異臭発生した事例が多数報告されている^{5~8)}。*Clostridium* 属菌は、土壌に広く分布し、小麦の常在菌である⁹⁾。パン生地の発酵工程においては、生地内部が嫌気状態となるため、小麦粉に潜在する偏性嫌気性芽胞形成菌が増殖し、酪酸を産生する可能性がある。しかし、製パン工程における *Clostridium* 属菌の挙動および酪酸産生に関する報告は、これまでほとんどない。

そこで本研究では、偏性嫌気性芽胞形成菌が産生した酪酸に起因する異臭発生の防止を目的として、市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌の調査を行うとともに、製パン工程における当該菌の挙動と酪酸産生の関連性について検討を行った。

【研究方法】

1. 市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌の調査

2016年から2017年の北海道産小麦粉を主体とし、北海道内の製粉企業3社および小売店からパン用小麦粉100検体を入手した。偏性嫌気性芽胞形成菌数の測定は、Gibbsらの方法¹⁰⁾を参考に実施した。すなわち、0.1%ペプトン加生理的食塩水で10倍希釈した試料原液を70℃で20分間加熱した後、10倍希釈液列を作成し、1 mL ずつ Differential Reinforced Clostridial Medium (以下 DRCM, Merck) 5本に接種した。これを35℃で72時間嫌気培養した後、培地が黒変したものを陽性とし、MPN法により菌数を測定した。

2. パン用小麦粉から分離した偏性嫌気性芽胞形成菌の酪酸産生能評価

DRCM 陽性試験管から偏性嫌気性芽胞形成菌を分離した。分離株は，GAM 培地を用い，35℃で24時間培養した酪酸産生量を比較した。酪酸産生量の測定は，固相吸着－溶媒抽出法により捕集した培養液のヘッドスペースガスを表1の条件でガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）に供し，内部標準のピーク面積に対する酪酸ピーク面積の相対値として算出することにより行った。なお，最も酪酸産生量の多い菌株は，16SrDNAの5'末端から約500bpの塩基配列を決定し，NCBIのNucleotide BLASTにより相同性の高い属種名を推定した後，指標菌として以後の試験に供した。

3. パン生地の発酵工程における偏性嫌気性芽胞形成菌の挙動と酪酸産生の検証

中種法による製パンを想定し，表2の通り，中種生地の発酵条件として標準的な27℃4時間の発酵と20℃または27℃で18時間の長時間発酵の3種の生地を調製した。小麦粉は，偏性嫌気性芽胞形成菌が非検出（<1.8MPN/g）のものを試験に供した。指標菌の芽胞は，非接種区を対照とし，生地に対して 10^2 または 10^4 spore/g接種し，各々 10^2 接種区または 10^4 接種区とした。中種生地の調製は，ホームベーカリー（HBS-100W，エムケー精工）を用い，原材料をねりコースで5分間混練した後，インキュベータで発酵を行った。

表1 GC-MS条件

機種	GCMS-QP2010-plus（島津製作所）
カラム	DB-WAX（アジレントテクノロジー）φ0.25mm×30m，膜厚0.25μm
注入方法	スプリットレス
試料気化室温度	250℃
昇温プログラム	40℃（2分保持）-140℃（5℃/分）-240℃（10℃/分，3分保持）
キャリアガス	ヘリウム，線速度制御（51.0cm/秒）
イオン源温度	200℃
イオン化法	EI

固相吸着－溶媒抽出法における注入量は1μLとした。

表2 中種生地の発酵条件

	発酵条件		
	27℃ 4 h	20℃ 16h	27℃ 16h
発酵温度（℃）	27	20	27
発酵時間（時間）	4	16	16
生地配合（g）			
小麦粉	210	210	210
ドライイースト	6	0.3	0.045
水または芽胞懸濁液*	120	120	120

*芽胞懸濁液は，生地中に 2.4×10^2 spore/g または 2.4×10^4 spore/g となるよう調製した。

学術研究助成による成果

中種生地の偏性嫌気性芽胞形成菌数の測定は、100ppm シクロヘキシミドおよび20ppm ポリミキシンBを添加したDRCMを用いたMPN法で行った。一般生菌数および酵母数の測定は、100ppm シクロヘキシミドを添加した標準寒天培地および100ppm クロラムフェニコールを添加したポテトデキストロース寒天培地を用い、平板塗抹法により行った。

中種生地の酪酸量測定は、固相マイクロ抽出法で捕集した中種生地のヘッドスペースガスを表1の条件でGC-MSに供し、内部標準のピーク面積に対する酪酸ピーク面積の相対値として算出することにより行った。

また、発酵後の中種生地200gをオープンで200℃、20分間焼成したものについても同様に酪産量の測定を行い、においの評価を行った。においの評価は、発酵条件ごとに非接種区を対照として、 10^2 接種区または 10^4 接種区について三点識別法¹¹⁾により行った。

【結果と考察】

市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌数の分布を図1に示した。偏性嫌気性芽胞形成菌数の平均値は、7.2MPN/g、最大値は 2.5×10^4 MPN/g、最小値は <1.8 MPN/gであり、全

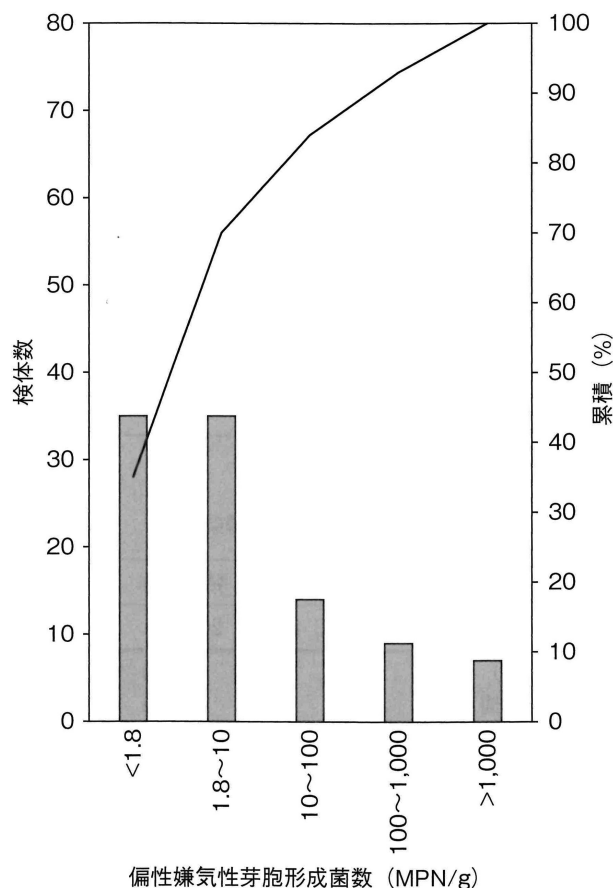


図1 市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌数の分布

体の65%から偏性嫌気性芽胞形成菌が検出された。パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌数を調査した事例は少ない^{12, 13)}。小麦澱粉では、偏性嫌気性芽胞形成菌数が $10^0 \sim 10^2$ CFU/gの範囲にあったことが報告されている¹⁴⁾。本研究で調査した小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌数は、 $10^0 \sim 10^4$ MPN/gであり、報告事例と比較して顕著に高い傾向を示した。

本研究の検体は、2016年から2017年の北海道産小麦粉が主体である。2016年8月には、北海道に観測史上初となる4個の台風が上陸・接近し、記録的な多雨となったことから¹⁵⁾、当該時期の小麦は水分が高い状態で収穫されたことが推察される。また、収穫された小麦は、トラックなどで乾燥施設への輸送中に堆積されるため、内部は嫌気条件となり、偏性嫌気性芽胞形成菌が増殖したものと推察される。

市販パン用小麦粉から分離した偏性嫌気性芽胞形成菌の酪酸産生量を図2に示した。分離した偏性嫌気性芽胞形成菌67株の酪酸産生量を比較した結果、56株が酪酸を産生し、No.57株が最も高い値を示した。本菌株を同定した結果、*Clostridium butyricum*と推定された。以後、本菌株を指標菌として用いた。

各種条件における中種生地の偏性嫌気性芽胞形成菌数の推移を図3に示した。27°C・4 hおよび20°C・18 hの場合、偏性嫌気性芽胞形成菌数は、発酵後に増加が認められなかった。一方、27°C・18 hの 10^2 接種区および 10^4 接種区で増殖が認められ、発酵前後の偏性嫌気性芽胞形成菌数は、 10^2 接種区で 2.2×10^2 MPN/gから 8.8×10^2 MPN/g、 10^4 接種区で、 2.3×10^4 MPN/gから 5.7×10^4 MPN/gに推移した。

各種条件で発酵した中種生地の焼成前後の酪酸量を表3に示した。27°C・4 hおよび20°C・18 hは、すべての試験区において、焼成前後の中種生地から酪酸はほぼ検出されなかった。一方、27°C・18 hの 10^4 接種区で高濃度の酪酸が検出され、非接種区および 10^2 接種区と5%水準で有意差が認められた。

使用した培地は異なるが、*C. butyricum*は至適発育温度である37°Cで4時間培養した場合にも、菌数や酪酸産生量はほぼ増加しないこと¹⁶⁾、*Clostridium*属は22°Cで発育が緩慢、または抑制されることが報告されており^{17, 18)}、本研究においても発酵条件27°C・4 hおよび20°C・18 hで同様の結果が得られた。

各種発酵条件の中種生地の焼成後のにおいの評価について、非接種区と 10^2 接種区または 10^4 接種区で三点識別試験を行った結果を表4に示した。27°C・4 hおよび20°C・18 hの 10^2 接種区および 10^4 接種区、27°C・18 hの 10^2 接種区は、非接種区と5%水準で有意差はなく、官能試験で差は認められなかった。一方、27°C・18 hの 10^4 接種区は、非接種区と1%水準で有意差が認められ、 10^4 接種区を焼成した中種生地は、チーズ様のフレーバーを呈した。また、27°C・18 hの 10^4 接種区の発酵生地に、本捏配合を加え、発酵後焼成したパンのにおいについて、同様に非接種区と三点識別試験を行った結果、中種焼成時と同じく、1%水準で有意差が認められ、酪酸臭の発生を確認した（データ非掲載）。これら官能試験の結

学術研究助成による成果

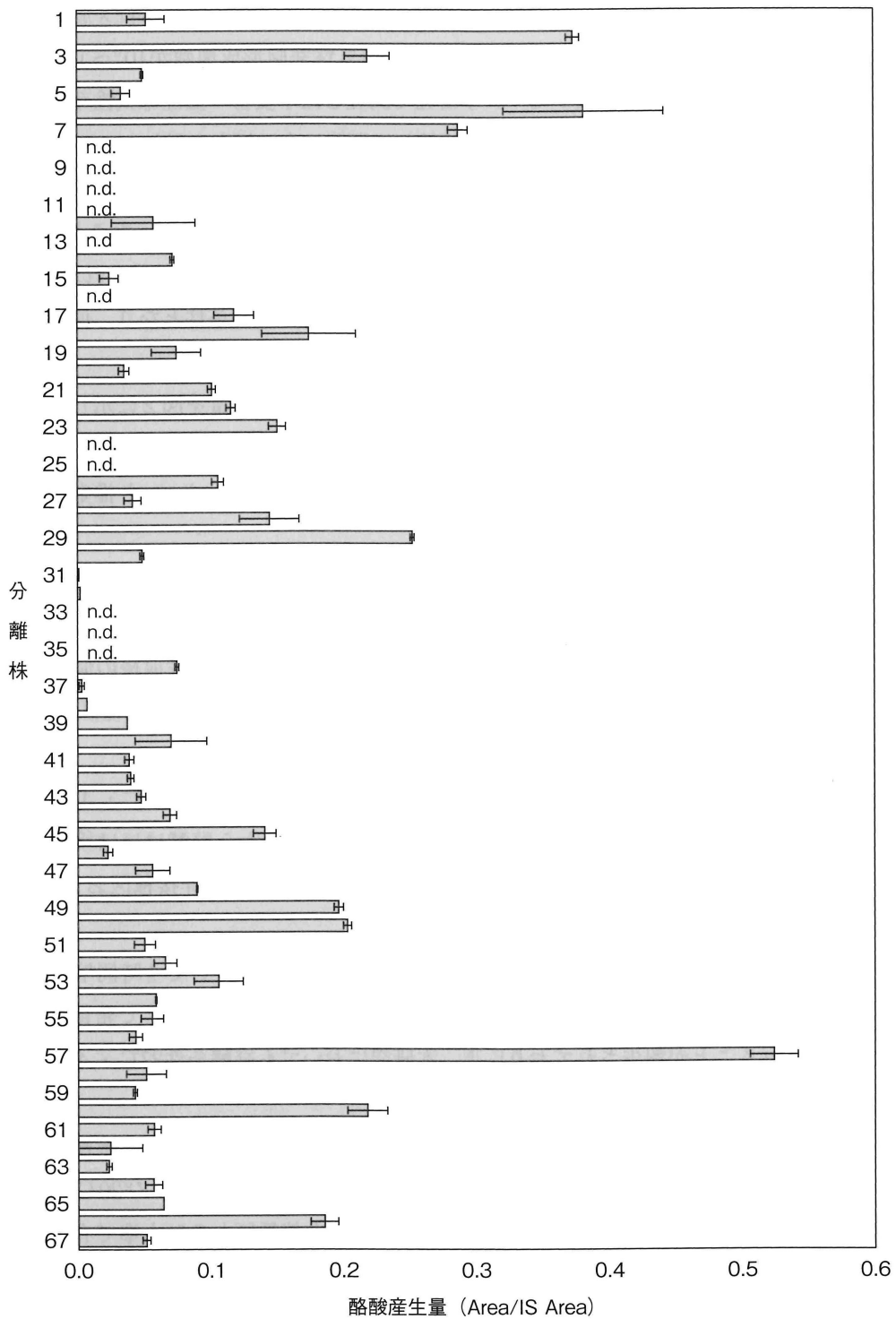


図2 市販パン用小麦粉から分離した偏性嫌気性芽胞形成菌の酪酸産生量

エラーバーは標準誤差を示し，n.d.は検出限界未満を示す。

各分離株の培養液のヘッドスペースガスをGC-MSにより測定し，内部標準（0.02%シクロヘキサノール）のピーク面積に対する酪酸ピーク面積の相対値を酪酸産生量とした。

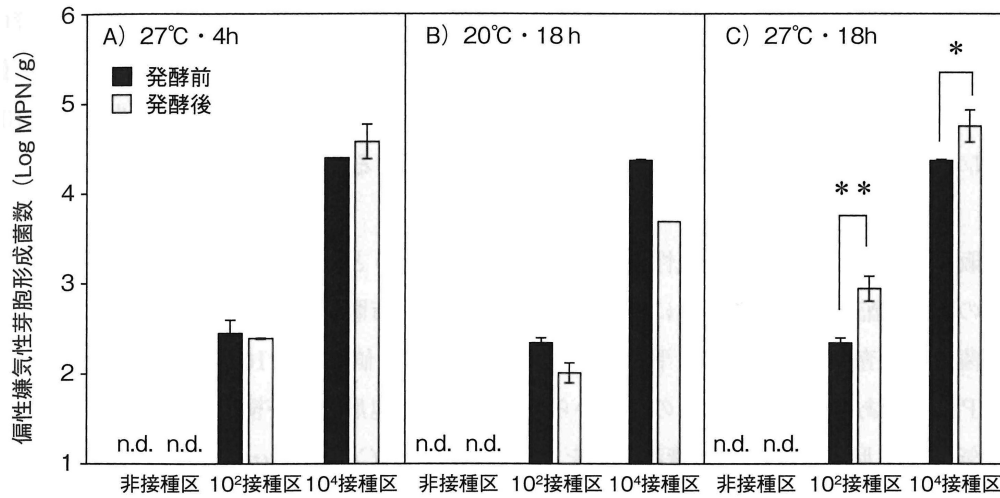


図3 各種条件における中種生地の偏性嫌気性芽胞形成菌数の推移

エラーバーは標準誤差，n.d.は検出限界未満（ $<1.8\text{MPN/g}$ ）を示す。

*および**は，5%および1%で発酵後有意に増加したことを示す（ t 検定）。

表3 各種条件で発酵した中種生地の焼成前後の酪酸量

発酵条件	芽胞	酪酸量 (Area/IS Area)	
		焼成前	焼成後
27°C · 4h	非接種	0.05 ± 0.02 n.s.	0.08 ± 0.02 n.s.
	10 ² 接種	0.03 ± 0.01 n.s.	0.06 ± 0.01 n.s.
	10 ⁴ 接種	0.05 ± 0.01 n.s.	0.04 ± 0.00 n.s.
20°C · 18h	非接種	0.03 ± 0.03 n.s.	0.00 ± 0.00 n.s.
	10 ² 接種	0.03 ± 0.03 n.s.	0.00 ± 0.00 n.s.
	10 ⁴ 接種	0.01 ± 0.01 n.s.	0.00 ± 0.00 n.s.
27°C · 18h	非接種	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	10 ² 接種	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
	10 ⁴ 接種	1.18 ± 0.21 b	2.10 ± 0.77 b

酪酸量は平均値 \pm 標準誤差を示す。

同一発酵条件間で異なるアルファベット間には5%水準で有意差があり，n.s.は有意差がないことを示す（Tukey法）。

表4 各種発酵条件の中種生地の焼成後のにおいの評価（三点識別法）

発酵条件	組合せ	回答数	正答数	P値	コメント
27°C · 4h	非接種 10 ² 接種	12	4	0.61	
	非接種 10 ⁴ 接種	12	3	0.82	
20°C · 18h	非接種 10 ² 接種	12	5	0.37	
	非接種 10 ⁴ 接種	12	3	0.82	
27°C · 18h	非接種 10 ² 接種	12	7	0.07	
	非接種 10 ⁴ 接種	12	10	<0.01	チーズ臭

$P < 0.01$ は，1%水準で有意に識別されることを示す（二項検定）。

学術研究助成による成果

果は、香気成分分析の酪酸量の結果と一致し、非接種区と当該区にの差は、発酵中に産生された酪酸に起因するものと考えられた。したがって、製パンにおける酪酸臭は、偏性嫌気性芽胞形成菌数と発酵条件に依存し、偏性嫌気性芽胞形成菌がパンの生地中に 10^4 MPN/g 存在し、かつ 27°C で18時間発酵することで発生することが明らかとなった。

〔要 約〕

市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌の調査を行うとともに、製パン工程における当該菌の挙動と酪酸産生の関連性について検討を行った。市販パン用小麦粉の偏性嫌気性芽胞形成菌数の調査を行った結果、平均値は7.2MPN/g、最大値は 2.5×10^4 MPN/g、最小値は < 1.8 MPN/gであり、全体の65%の検体から偏性嫌気性芽胞形成菌が検出された。分離した偏性嫌気性芽胞形成菌67株の酪酸産生量を比較した結果、*Clostridium butyricum* No.57株が最も高い値を示した。*C. butyricum* No.57の芽胞を非接種または 10^2 または 10^4 spore/g となるよう接種した中種生地を3条件（ $27^\circ\text{C} \cdot 4 \text{ h}$ 、 $20^\circ\text{C} \cdot 18 \text{ h}$ および $27^\circ\text{C} \cdot 18 \text{ h}$ ）で発酵した結果、 $27^\circ\text{C} \cdot 18 \text{ h}$ の 10^2 接種区および 10^4 接種区において、指標菌の増殖が認められた。各種条件で発酵した中種生地の酪酸量を測定した結果、 $27^\circ\text{C} \cdot 18 \text{ h}$ の 10^4 接種区の焼成前後の生地から高濃度の酪酸が検出された。非接種区を対照とし、 10^2 および 10^4 接種区の焼成生地について、三点識別法での評価を行った結果、 $27^\circ\text{C} \cdot 18 \text{ h}$ の 10^4 接種区は、非接種区と1%水準で有意差があり、チーズ様のフレーバーを呈した。したがって、製パンにおける酪酸臭の発生は、酪酸を産生する偏性嫌気性芽胞形成菌数と生地の発酵条件に関係し、当該菌の芽胞が 10^4 spore/g 存在する生地を 27°C で18時間発酵した場合に発生することを明らかにした。

引用文献

- 1) 独立行政法人国民生活センター：「消費生活年報2018」
- 2) 内藤茂三：和洋菓子の酵母による変敗と防止技術，防菌防黴，**27**，821～832，1999.
- 3) 有田富和，宮崎麻由，植木洋，加藤浩之，那須務，渡邊節，沖村容子，御代田恭子：不良食品からの酵母様真菌類の分離と同定，宮城県保健環境センター年報，**28**，42～44，2010.
- 4) 内藤茂三：*Bacillus* 属細菌による食品の変敗現象，「食品の変敗微生物—その原因菌と制御—」，幸書房，79～87，2016.
- 5) 豊田修次，小林洋子，安彦健吉：膨張ゴーダチーズより酪酸菌の分離とその性状，日本畜産学会報，**61**，599～605，1989/
- 6) Matteuzzi, D., Trovatelli, L. D., Biavati, B., Zani, G.: Clostridia from grana cheese, *J. Appl. Bacteriol.*, **43**, 375～382, 1977.
- 7) 伊藤寛：味噌のふくれと酪酸菌，日本醸造協会雑誌，**63**，405～409，1968.
- 8) 宮尾茂雄：漬物と微生物，日本食品微生物学会雑誌，**22**，127～137，2005.
- 9) 梶原景光：小麦粉の微生物がその加工食品の品質に及ぼす影響，化学と生物，**10**，93～100，1972.
- 10) Gibbs, B. M., Freame, B.: Methods for the recovery of clostridia from foods, *J. Appl. Bact.*, **28**, 95～111, 1965.

個人研究

- 11) 相島鐵郎：食品ラボにおける官能評価（2），日本食品科学工学会誌，**48**，378～392，2001.
- 12) Sherfi, S. A., Hamad, S. H. : Microbiological and biochemical studies on gergoush fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**, 247～52, 2001.
- 13) 松田典彦，駒木勝，松縄桂子：缶・びん詰およびレトルト食品製造用副原料の耐熱性嫌気性細菌胞子による汚染状況，缶詰時報，**60**，207～212，1981.
- 14) 鈴木繁男：馬鈴薯澱粉および小麦澱粉中の耐熱性細菌数について，澱粉工業学会誌，**6**，121～134，1958.
- 15) 農林水産省：「平成28年度北海道食料・農業情勢報告」
- 16) He, G. Q., Kong, Q., Chen, Q. H., Ruan, H. : Batch and fed-batch production of butyric acid by *Clostridium butyricum* ZJUCB, *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.*, **6**, 1076～1080, 2005.
- 17) Bryant, M. P., Burkey, L. A. : The characteristics of lactate-fermenting spore forming anaerobes from silage, *J. Bacteriol.*, **71**, 43～46, 1956.
- 18) Gibson, T., Stirling, A. C. Keddie, R. M., Rosenberger, R. F. : Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures, *J. gen. microbiol.*, **19**, 112～129, 1958.