

微生物利用によるパンの風味向上に関する技術開発

中川良二, 田中 彰

Technical Development of Bread using Microorganisms for Taste Improvement

Ryoji Nakagawa and Akira Tanaka

Sour doughs were fermented with starter cultures of facultative, heterofermentative lactic acid bacteria (FH-LAB) in combination with dry yeast and with or without pentose in order to assimilate lactic acid bacteria. The sour doughs mainly produced lactic acid in organic acid, and the production of acetic acid increased with arabinose, which is a kind of the pentose. The ratio of the FH-LAB to dry yeast changed with the production of acetic acid, meaning that it could regulate the acidity. The sour doughs fermented with the *Lactobacillus pentosus* strain had higher acetic acid equivalents than the two *Lactobacillus plantarum* strains used in the experiment. The bread baked with a sour dough contained higher amounts of acetic acid and a stronger acidic taste; they also contained four times as much volume of free amino acids compared to the reference bread. The results indicate that the FH-LAB have unique fermentation characteristics and can produce sourdough breads with a high taste quality.

KEY-WORDS : sourdough, lactic acid bacteria, bread, flavor, pentose

キーワード : サワー種, 乳酸菌, パン, 風味, ペントース

イーストと乳酸菌を共発酵させて製造される発酵種はサワー種と呼ばれ, これを用いるパン (サワーブレッド) は, 共発酵によって生成される有機酸, 特に酢酸による酸味や風味を有する。サワー種の歴史は古く, 主に伝統的に受け継がれた製法でつくられることから, かなりの熟練と労力を要する。しかし, 近年は世界各地のサワー種から微生物の分離・同定が行われ, これらをスターターとして用いたサワー種に関して報告されている^{1)~4)}。

一方, 発酵安定性の高いイーストの普及や冷凍生地的发展, 製パン作業の効率化とともに, パンの風味不足が問題視されるようになり, サワー種の複雑な風味や好ましい食感などが見直されつつあり, サワー種を用いた様々なパン製造技術が開発された^{5)~7)}。しかしながら, これらの技術は使用する乳酸菌株の特性に依存しており,

基本的に一定の酸味しか付与することができない。

そこで, 本研究では, 通性ヘテロ発酵型乳酸菌及び炭素源としてペントースを用いたサワー種の製造において, 通性ヘテロ発酵型乳酸菌の添加量に対するイーストの添加量を調節することにより, サワー種の酸味を調節できることを明らかにし, これを用いたサワーブレッドを試作評価した。通性ヘテロ発酵型乳酸菌とは, グルコースを炭素源とした場合はホモ型発酵を行って乳酸を生成するが, ペントースやグルコン酸等を炭素源とした場合にはヘテロ型発酵を行って乳酸, 酢酸, エタノール等を生成する乳酸菌であり, 条件的ヘテロ発酵型乳酸菌とも呼ばれる。*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*などが属する^{8) 9)}。

事業名: 経常研究

課題名: 微生物利用によるパンの風味向上に関する技術開発

実験方法

1. 供試乳酸菌株の選択

当センター保有乳酸菌株から、通性ヘテロ発酵型である *Lactobacillus pentosus* の1株（以下、L-PEと略す）、*Lactobacillus plantarum* の2株（以下、L-PL-1、L-PL-2と略す）を選択した。乳酸菌株はMRS液体培地（Difco）を用い、30℃、24時間静置培養した。培養後、遠心分離（3,000rpm、10分）により菌体を回収し、生理食塩水に懸濁して以下の実験に供した。

2. サワー種の作製

サワー種は、小麦粉に同量の水、市販のドライイースト（ $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/g）、乳酸菌懸濁液（ $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ CFU/g）、アラビノース（アラビノ、三和澱粉）を加え混合した後、30℃で24時間または48時間の発酵により作製した。

3. サワーブレッドの試作

サワーブレッドは、ホームベーカリー（SD-BMS106、パナソニック）を用い、取扱説明書に記載の食パンモードに準じた生地組成および製造条件にて焼成した。すなわち、生地組成は作製したサワー種200gに、小麦粉150g、バター10g、砂糖17g、食塩5g、ドライイースト4g、水80mLとした。

4. 化学分析

有機酸はサンプル1gあたり9mLの蒸留水を添加混合し、遠心分離（3,000rpm、10分）により得た上清をフィルターろ過した後、HPLC有機酸分析システム（Prominence型、島津製作所）を用いて測定した。アミノ酸はアミノ酸

自動分析計（L-8900型、日立ハイテクノロジーズ）を用い、取扱説明書の生体成分分析法に準じて測定した。

実験結果および考察

1. サワー種の作製におけるアラビノース添加の影響

本試験でのサワー種は乳酸菌株としてL-PEを用いた。サワー種の有機酸を分析したところ、主にコハク酸、乳酸、酢酸を含有した。サワー種に糖類としてアラビノースを添加した場合、24時間よりも48時間の発酵により酢酸の生成量が顕著に増加した。一方、アラビノース無添加では、酢酸の生成量は僅かであった（データ省略）。有機酸生成量におけるドライイースト添加量の影響を調べた（表1）。試験した 1×10^7 CFU/g \sim 1×10^8 CFU/g において、乳酸は 1×10^7 CFU/g で最も多く生成された。一方、コハク酸生成量はドライイースト添加量の増加とともに増加した。酢酸生成量は 1×10^7 CFU/g に比べて $3 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ CFU/g で顕著に増加し、 5×10^7 CFU/g で最大の生成量（ 1×10^7 CFU/g の約5倍）となった。

サワー種の有機酸量に及ぼす乳酸菌およびドライイースト添加量の影響を調べた（表2）。酢酸生成量は乳酸菌添加量 2×10^5 CFU/g では、 1×10^7 CFU/g のドライイーストを添加した場合に酢酸生成量が8.25mMであったが、 3×10^7 CFU/g のドライイーストを添加した場合には32.69mMと約4倍に増加した。しかし、乳酸菌添加量を10倍の 2×10^6 CFU/g 以上に増やすと酢酸生成量は減少する傾向にあった。

L-PE株以外の通性ヘテロ発酵型乳酸菌株でも同様にアラビノース添加によって酢酸生成が増加するかを調べ

表1 サワー種の有機酸量に及ぼすドライイースト添加量の影響 (mM)

添加量 (CFU/g)	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
1×10^7	0.00±0.00	1.53±0.01	83.89±0.04	8.25±0.07
3×10^7	0.00±0.00	2.96±0.01	72.55±0.11	32.69±0.10
5×10^7	0.00±0.00	3.97±0.02	81.08±0.06	39.64±0.08
1×10^8	0.00±0.00	5.23±0.01	80.87±0.05	35.37±0.06

小麦粉に同量の水を加え、アラビノース (10mg/g)、乳酸菌株 (2×10^5 CFU/g)、ドライイーストを添加し、30℃で48時間発酵。

表2 サワー種の有機酸量に及ぼす乳酸菌およびドライイースト添加量の影響 (mM)

乳酸菌 (CFU/g)	ドライイースト (CFU/g)	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
2×10^5	1×10^7	0.00±0.00	1.53±0.01	83.89±0.04	8.25±0.07
2×10^5	3×10^7	0.00±0.00	2.96±0.01	72.55±0.11	32.69±0.10
2×10^6	3×10^7	0.00±0.00	2.79±0.02	76.67±0.24	30.58±0.01
1×10^7	3×10^7	0.00±0.00	2.57±0.01	82.51±0.09	26.36±0.04

小麦粉に同量の水を加え、アラビノース (10mg/g)、乳酸菌株 ($2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ CFU/g)、ドライイースト (1×10^5 , 3×10^7 CFU/g) を添加し、30℃で48時間発酵。

表3 通性ヘテロ発酵型乳酸菌株によるサワー種の有機酸分析 (mM)

乳酸菌株	アラビノース	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
L-PE	無添加	0.00±0.00	3.15±0.03	63.93±0.16	7.56±0.04
L-PL-1		0.00±0.00	3.42±0.00	55.45±0.10	7.26±0.04
L-PL-2		0.00±0.00	2.81±0.01	67.35±0.08	5.24±0.12
L-PE	添加	0.00±0.00	2.96±0.01	72.55±0.11	32.69±0.10
L-PL-1		0.00±0.00	3.26±0.01	63.61±0.03	25.03±0.04
L-PL-2		0.00±0.00	2.90±0.01	75.46±0.06	19.19±0.03

小麦粉に同量の水を加え、アラビノース (10mg/g)、乳酸菌株 (2×10^5 CFU/g)、ドライイースト (3×10^7 CFU/g) を添加し、30°Cで48時間発酵。

た(表3)。アラビノース無添加区ではL-PE, L-PL-1, L-PL-2株はそれぞれ7.56, 7.26, 5.24mMの酢酸を生成した。アラビノース添加区ではそれぞれ32.69, 25.03, 19.19mMの酢酸を生成し、L-PL-1及びL-PL-2株はL-PE株に及ばないもののアラビノース存在下で酢酸生成を増加させることが明らかとなった。この結果は、通性ヘテロ発酵型乳酸菌株がサワー種の作製過程でイーストとの共培養によりアラビノース存在下で酢酸生成を増加させることを示唆し、サワー種の酸味の調節に利用可能であることを示すものである。

通性ヘテロ発酵型乳酸菌は、グルコースとペントースの存在下ではグルコースを優先的に資化して乳酸を生成するが、グルコースが不足又は欠乏すると、ペントースを資化して乳酸、酢酸等を生成する⁸⁾。本研究におけるサワー種の作製に関する試験では、通性ヘテロ発酵型乳酸菌とイーストが生育のため優先的に資化する炭素源で

あるグルコースをめぐる競争することでグルコースの不足又は欠乏が生じ、その結果として乳酸菌がペントースであるアラビノースを資化し始めることで酢酸が高生成されると考えられる。乳酸菌とイーストの添加量により競争の程度が異なり、生成される酢酸量に変化が生ずるのもそのことが主な要因であると推察される。

2. サワーブレッドの焼成および評価

実験方法に記載した条件にてサワー種を用いたサワーブレッドを試作した(図1)。

表4にサワーブレッドの有機酸分析の結果を示した。アラビノース無添加のサワーブレッドは、乳酸43.95mM、酢酸5.02mMを含み、乳酸を主要な有機酸とした。アラビノース添加のサワーブレッドは、乳酸41.83mM、酢酸15.69mMを含み、酢酸を多く含むことが示された。また、コントロールはサワー種を用いない条件で焼成したパンであり、乳酸0.41mM、酢酸4.77mMを含有した。

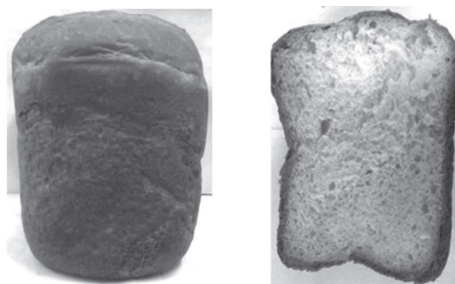


図1 サワーブレッド試作品

表4 サワーブレッドの有機酸分析 (mM)

処理	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
アラビノース無添加	0.09±0.02	3.62±0.03	43.95±0.08	5.02±0.00
アラビノース添加	0.79±0.00	2.06±0.01	41.83±0.10	15.69±0.03
コントロール	4.14±0.03	3.00±0.01	0.41±0.04	4.77±0.07

発酵種は小麦粉に同量の水を加え、アラビノース (10mg/g)、ドライイースト (5×10^7 CFU/g)、乳酸菌株 (2×10^5 CFU/g) を添加し、30°Cで48時間発酵したもの。コントロールは通常の条件で焼成したもの。

表5 サワーブレッドのアミノ酸組成 (μg/g 乾燥重量)

	コントロール	アラビノース無添加	アラビノース添加
Asp	1.6	14.5	24.2
Thr	4.2	13.6	18.4
Ser	4.3	8.6	16.5
Asn	1.3	13.4	29.3
Glu	34.0	57.6	55.8
Gln	0.7	7.7	17.6
Pro	44.0	38.3	32.6
Gly	13.3	30.6	32.9
Ala	21.6	104.5	91.6
Val	7.1	51.6	56.8
Met	0.0	3.6	20.4
Ile	1.8	25.2	46.4
Leu	3.0	60.8	129.7
Tyr	2.0	34.6	38.1
Phe	1.3	70.3	91.5
Trp	0.0	26.7	24.1
Lys	9.1	40.1	57.0
His	0.0	0.0	2.5
Arg	13.6	59.3	66.0
TOTAL	162.9	661.0	851.3

表5に呈味成分である遊離アミノ酸の結果を示した。サワーブレッドはアミノ酸を多く含み、コントロール区は162.9 μg/g 乾燥重量であったが、アラビノース無添加区およびアラビノース添加区ではそれぞれ661.0, 851.3 μg/g 乾燥重量で、アラビノース添加区が最も多くアミノ酸を含有した。このことは、サワー種を用いることにより風味に優れるパン製造が可能であることを示唆する。また、サワー種添加区ではアラビノース無添加区およびアラビノース添加区でアミノ酸組成に違いが見られ、風味の特徴が異なる可能性が推察された。今後は揮発成分なども含め詳細な科学的な風味評価が必要である。

要 約

ドライイーストと通性ヘテロ発酵型乳酸菌をスターターとし、さらに炭素源として通性ヘテロ発酵型乳酸菌が資化できるアラビノースを添加した条件でサワー種を作製した。作製されたサワー種は主に乳酸を生成したが、アラビノース添加は酢酸の生成量を増加させた。また、通性ヘテロ発酵型乳酸菌の添加量に対するイーストの添加量を調節することにより、酢酸の生成量が変化し、サワー種の酸味を調節できることが明らかとなった。通性ヘテロ発酵型乳酸菌としては *Lactobacillus pentosus* が酢酸生成量に優れていた。これを用いたサワーブレッドを焼成したところ、酢酸量が多く、高アミノ酸量のパンがつくられた。このことから、当該技術は新たな風味に特徴を有するパン類の製造方法となり得ることが示された。

文 献

- 1) Lonner, C., Welander, T., Molin N., Dostalek, M., and Nlickstad, E. (1986). The microflora in a sour dough started spontaneously on typical swedish rye meal. *Food Microbiol.*, **3**, 3-12.
- 2) Gül H., Özçelik S., Sağdıç O., and Certel M. (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochem.*, **40**, 691-697.
- 3) Paramithiotis, S., Tsiasiotou, S., and Drosinos, E.H. (2010). Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur. Food Res. Technol.*, **231**, 883-890.
- 4) Choi, H., Kim, Y.W., Hwang, I., Kim, J., and Yoon, S. (2012). Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chem.*, **134**, 2208-2216.
- 5) 深沢忠史, 貝沼謙, 六波羅文昭, 和田 寿 (2004). パン類の製造方法. 特許第4775689号, 7月8日.
- 6) 貝沼謙, 酒井美穂, 水田潤, 後藤雅文, 中村美香子, 高橋美峰, 桑原拓郎 (2005). 乳酸菌を用いた発酵種の調製方法. 特許第4402633号, 11月6日.
- 7) Nakata, H., Hasegawa, H., Sakurai, H., and

- Tamura, M. (2010). Distinctive flavor and strong antifungal activity in a sourdough bread made using unique Lactic acid bacteria obtained from a sugar factory, *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi), **57**, 85-90 (仲田弘明, 長谷川秀樹, 櫻井博章, 田村雅彦. 製糖工程から分離した乳酸菌を用いたサワーブレッドの風味と防カビ性能, 日本食品科学工学会誌).
- 8) Axelsson, L. (2004). Acid lactic bacteria: classification and physiology, In "Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects." ed. By Salminen S, Wright A. V., Ouwehand A., Marcel Dekker Inc, New York, pp. 1-66.
- 9) Torriani, S., Felis, G.E., and Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3450-3454.