

中華まん用酵母としての野生酵母の評価

Evaluation of wild yeast as a yeast for Chinese buns

2024年9月

三重大学大学院地域イノベーション学研究科

中村 昌弘

目次

第1章 緒言

1.1 研究背景	1
1.2 本研究の目的と本論文の構成	3
図	4

第2章 中華まん生地用野生酵母の採取と選抜

2.1 緒言	5
2.2 方法	5
2.3 結果	8
2.4 考察	13
図	16
表	21
参考資料	28

第3章 選抜した野生酵母の特性と中華まん生地への活用について

3.1 緒言	33
--------	----

3.2	方法	34
3.3	結果	37
3.4	考察	38
	図	40
	表	50
第4章	総括	53
	引用文献・引用URL	55
	要約	60
	学会発表および論文への発表実績	61
	謝辞	62
	英文要約	63

第1章 緒言

1.1 研究背景

1.1.1 中華まん市場について

中華まんは、名前の通り中国で生まれた蒸し饅頭であるが、日本においては生地や具材などで独自に進化し、市場を広げた [i].

日本国内において中華まん市場は、CVS（コンビニエンスストア）の店舗増加や食シーンの広がりにより、市場規模が拡大しており、平成30年度には、前年比2%増の680億円を達成し、その市場規模は700億円目前となっていた [ii]. しかしながら、令和元年度、令和2年度は、暖冬や新型コロナウイルスの蔓延により、CVSでの中華まんの販売は停滞した [iii]. 一方、量販店（スーパーマーケット、ドラッグストア等）においては、「巣ごもり需要」があり、袋入り製品、特に冷凍食品の売上が伸び [iv], CVSの売り上げ減をカバーしたが、市場全体の売り上げ規模は若干の減少となった。令和3年度以後は、コロナ禍の影響が少なくなってCVSでの販売が回復傾向になり、令和5年度においては、CVSでの販売は、コロナ禍以前の水準にほぼ回復したとされており [v], 令和6年度以降、市場規模がさらに拡大することが期待されている。

こうした市場において、中華まん製品の販売競争が激化している。さらなる市場拡大を目指し、CVS各社の販売競争が激しくなっており、本格的な具材と併せ、「ふっくら」や、「もちり」と表現された、柔らかくかつ弾力があってしっかりとした特徴ある食感を有する生地の中華まん製品が高価格帯の商品として市場に出ている。

1.1.2 中華まん生地について

中華まんは、小麦粉・水・砂糖・イースト（パン酵母）・ベーキングパウダーなどを捏ねて作った柔らかい皮で具材を包んで、発酵させた後に蒸しあげられることによってつくられる饅頭（まんじゅう）である。

中華まんの製造は、一般に図1-1に示したストレート法と呼ばれる工程により行われている。すなわち、小麦粉（中力粉または中強力粉）、ベーキングパウダー、食塩、砂糖を混合し、イースト及び水を添加後捏ね、生地をまとめた後ラードを添加し、さらに捏ねる。こうしてできた生地を延ばし、薄い膜が形成（グルテンの形成を確認）され、生地捏ねを

完了する。捏ね上がった生地を計量し、丸めた後、さらに薄く引き延ばす。引き延ばした生地で具材を包み、丸く成形されたものを発酵させ、15分～20分程度蒸すことにより完成する。パン生地と同様に添加するイーストの発酵による炭酸ガスの発生によって中華まん生地は、膨化し、蒸されることでふっくらとしたものになる。炭酸ガスの発生力に関しては、イーストが糖類を発酵してアルコールと炭酸ガスを生成することを利用しており、発生した炭酸ガスを小麦タンパク質のグルテンにより保持することで、ふっくら感が成り立っている [1, vi].

中華まんの生地は、最近では、メーカー独自の製法で作られている場合も多く見受けられる。中種法（生地を2段階で発酵させる製法で、1段階めで低温で長時間発酵させることで、食感の改良を行っている）が用いられる場合もあるが、中種法を改良した製法として、「2段階発酵」と呼ぶ場合もある。また、もちり感のある生地を実現するために、少量の米粉を混ぜたり、加工方法を見直した小麦粉を使用する等、配合上の工夫がされている。

1.1.3 野生酵母の活用について

一般に使用されているイーストは、当初は自然界からの原料等により入ってきたものと考えられる。これらは長い年月をかけて、選抜と保存を経て現在までに実用に至り、イーストとして使用されるようになった [2]。この過程で、基質の特異性（マルトースの資化性など）や望ましい性質（発酵で生じる香気成分など）での選抜を繰り返してきた結果、多くのイーストは、似たような性質となってきた。こうした中で、様々な発酵食品において、新たな消費を拡大する上で、従来とは異なる特性を持つような酵母が求められている [3]。

一方、近年の消費者の動向として、自然や天然を重視する傾向がある。パン市場においては、「自然や天然」をコンセプトとした「野生酵母」を活用したパンが人気を得ており、商品名やキャッチコピーとして「天然酵母」が表示されている。一般に穀物や果物に付着した酵母や乳酸菌などの微生物を増殖させた発酵種（パン種）を利用して作られており、通常のイーストを使用したパンとは、官能的に異なるパンとして開発されている [1, vi]。これまでも、自然界から野生酵母を採取し、使った事例は、パン [1, 3-17] や酒類 [18-26] で数多く紹介されている。これらの中には、その食感や香り、おいしさなどの特性が付加価値として評価されている事例も多く見受けられる。

パン生地への野生酵母の使用については、野草などの花、果実、樹液等から、単離した酵母を *Saccharomyces cerevisiae* と同定した上で、使われている例が多数報告されている [3, 12]. また一部, *Saccharomyces* 属以外の酵母についても検討されている [10, 17]. 一方で、「自家製天然酵母使用」をうたい、昔ながらの方法として種起こしをしてパンに使用されている事例では、菌種を同定せずに使用される場合も見受けられる [vi].

1.2 本研究の目的と本論文の構成

1.2.1 本研究の目的

すでにパンや酒類などで野生酵母を使った製品がある中で、パンと同様にイーストを発酵に使う中華まんにおいて、野生酵母を使った製品は、市場では見られていない。これは、中華まんの市場規模は拡大しつつあるものの、パンの市場規模に比べて小さく、現在の商品開発の主流が生地よりも、具材を中心に行われていることなどが考えられる。

本研究では、中華まん生地の発酵に野生酵母が利用できるかどうか検討することを目的とした。野生酵母を採取・単離し、炭酸ガスの発生、基質利用性の試験から、酵母種の絞り込みを行い、実際に生地に使うことで膨化できるかどうかの試験を行った。さらに、得られた野生酵母について、生地の成分の特徴を調べ、中華まん生地へ利用できるかについて考察した。

1.2.2 本論文の構成

本論文では、植物から単離した野生酵母が、中華まん生地へ利用できるかどうかを評価するために、単離した野生酵母による生地の発酵性の検討を行った。

第2章では、野生酵母を単離し、単離した菌について、ガス発生性から見る発酵能による選抜、菌の同定により食経験の有無の検討を行い、さらに、中華まん生地に一般的に使われる糖質源のスクロースを基質とした炭酸ガス発生発酵試験、中華まん生地における発酵試験（膨化試験）を行い、中華まん生地の発酵に適した酵母の選抜を行った。

第3章では、選抜した酵母について、アルコール発酵能、乳酸発酵能、香気成分やアミノ酸、有機酸分析を行い、その成分を従来の酵母を使った中華まん生地と比較することにより、その特徴について考察した。

第4章では、総括として、論文全体の流れと今後の課題をまとめた。

図

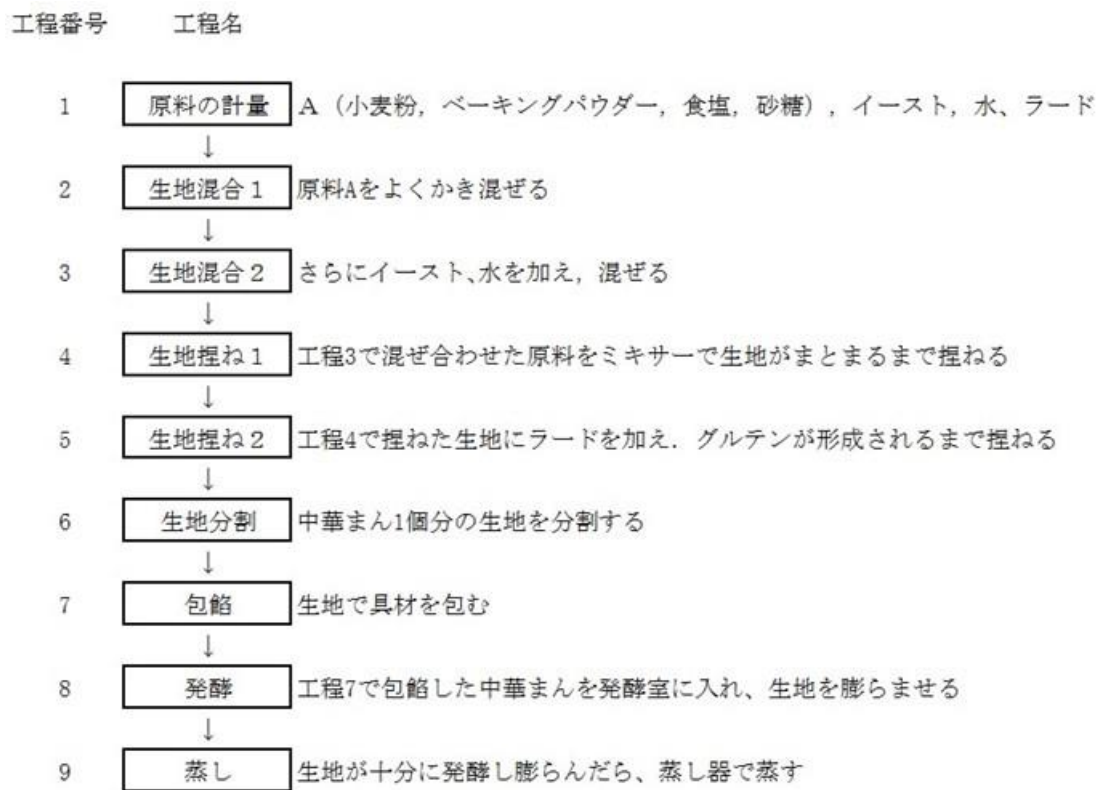


図 1-1 中華まん製造の基本工程（ストレート法）

第2章 中華まん生地用野生酵母の採取と選抜

2.1 緒言

本章では、野生酵母を利用する中華まん生地の開発を目的に、野生酵母を分離し、それらの基質資化性や炭酸ガス発生能等に基づいて、スクリーニングを行った。

すなわち、野生酵母の分離については、地域ブランド化の可能性も考慮して、野生酵母が存在する可能性のある植物試料（果実、野菜、花、樹木など）を三重県内から採取または入手した。また、和菓子の餡の素材である小豆の花と莢についても特徴ある野生酵母源試料として、栽培地の北海道十勝地方の生産者より入手した。取得した酵母については、単離後の簡易同定で、従来の中華まん生地に用いられている *Saccharomycetaceae* 科であること、中華まんで使用される炭素源がスクロースであることから、スクロースでの発酵性（炭酸ガス生産性）があること、生地においても膨化することが重要で、このような観点での選抜を行った。

2.2 方法

2.2.1 試料の収集

梨（新興梨，三重県津市），ブドウ（ピオーネ，伊賀乙女，ロザリオビアンコ，三重県名張市），アケビ（三重県津市），マコモ（三重県三重郡菰野町），リンゴ（シナノゴールド，三重県津市），柿（次郎柿，三重県津市），干し柿（三重県津市），イチゴ（かおりの，三重県津市），ビワ（三重県津市），ミカン（三重県南伊勢市）を三重県内各地の道の駅，直営店等で購入した。また，桜（三重県津市），梅（三重県津市），芝桜（三重県津市），野生の花5種（三重県津市，伊勢市），コナラの樹液（三重県津市）を採取した。また，小豆の花および莢を北海道中川郡幕別町の小豆栽培農家から入手した。

2.2.2 菌株の単離

菌株の分離と培養にはMY培地 [表 2-1, pH 6.6] を使用した。MY培地の組成を，麦芽エキス (Bacto Malt Extract, Life Technology Corporation) 0.3%，酵母エキス (乾燥酵母エキス, ナカライテスク) 0.3%，ポリペプトン (ハイポリペプトン, 富士フィルム和

光純薬) 0.5 %, グルコース (富士フィルム和光純薬) 2 %または, スクロース (富士フィルム和光純薬) 1 %とし, クロラムフェニコール (富士フィルム和光純薬)) を 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え培地を調製した. 固体平板培地の場合は, 2 %寒天 (精製寒天末, 理科研) を添加した. 培地を 121 $^{\circ}\text{C}$, 20 分間オートクレーブにより滅菌した.

酵母の分離には, 同固体平板培地を使用した. 植物試料表面を白金耳でなぞって (樹液については綿棒) 滅菌生理食塩水 10 ml に懸濁し, 適宜希釈した懸濁液 20 μl を培地表面に塗抹し, この培地を 30 $^{\circ}\text{C}$, 48 時間培養し, 得られたコロニーについて, 目視により酵母とみなせるものを単離した.

2.2.3 単離した菌株の発酵試験と光学顕微鏡観察による確認

1 % スクロースを含む MY 液体培地 (pH 6.6, MYG 培地よりグルコースを除いて代わりにスクロースを添加したもの) を 10 ml ずつ試験管に分注し, Dhrham 発酵管を入れオートクレーブにより滅菌した. 単離した菌株 1 白金耳を滅菌済み 10 ml 生理食塩水にて懸濁し, 懸濁液 100 μl を試験管に加え, 30 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間培養後, Dhrham 管内に蓄積した炭酸ガスの有無を目視で観察した. 炭酸ガスを発生した菌株については, 光学顕微鏡 (Olympus BX51) により形状や出芽を観察し, 酵母であることを確認した.

2.2.4 菌株の ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域の塩基配列の解析

食用として実績のある酵母を選抜するために, 信頼性のある酵母同定法として利用される菌株のリボソームをコードする領域 (rRNA シストロンの内部転写スペーサーの ITS 領域) の塩基配列の相同性を調べる方法を用いた [27, 28]. 各菌株を液体培養して, 培養液 20 μl を遠心分離して菌体を回収した. この菌体を 180 μl の 50 mM 水酸化ナトリウム溶液に懸濁して, 沸騰水浴により 10 分間加熱した. 室温に冷却後, 20 μl の 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で中和し, 遠心分離 (13,200 $\times g$, 10 分) により細胞残渣を取り除いた. 得られた上澄み液 2 μl を PCR 反応の鋳型として使用した. PCR 反応については, KOD One (東洋紡) を使用し, メーカーの指示に従い DNA 増幅を行った. 増幅には ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') と ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') のプライマーを用い, 40 mM トリス酢酸-1 mM エチレンジアミン四酢酸緩衝液中, 0.8 % アガロースゲルによる電気泳動を行い, 臭化エチジウムによる染色により増幅された DNA を確認した. 増幅した DNA 断片を ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) で処理し, 塩基配列決定のため

の鋳型とした。塩基配列の決定を三重大学遺伝子実験施設に依頼した。ITS4 プライマーを使用して BigDye Terminator cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) でシーケンス反応を行い、反応後 DNA 試料を、AB3730 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) に供して塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとに、国際 DNA データベースに対して BLAST アルゴリズムで相同性を検索し、相同性を算出した。

2.2.5 菌株の発酵（炭酸ガス発生）試験

菌株の糖類への資化性を調べるため、炭素源として 2 % グルコース、1 % スクロース、1 % マルトース、1 % でんぷん（溶性）を含む MY 液体培地（pH 6.6）を 10 ml ずつ試験管に分注し、Dhrham 発酵管を入れ滅菌した。これに酵母を植菌し（植え付け方法は、2.2.3 と同じ）、30 °C で培養し、24 時間、48 時間後に、炭酸ガスの発生の様子を確認した。炭酸ガス発生の程度は、Dhrham 発酵管に貯まる炭酸ガス量を目安にして判定した。

炭素源としてスクロースを用いる実験での炭酸ガスの発生量は、培養によって減少した培養液の重量とした。すなわち、1 %スクロースを炭素源とする滅菌した 10 ml の MY 液体培地（pH 6.6）に、酵母を植菌し（植え付け方法は、2.2.3 と同じ）、30 °C で培養した。培養液の全重量を 3 日間、24 時間毎に測定し、その重量差を求めた。

2.2.6 生地発酵試験

2.2.6.1 選抜した菌株の培養

選抜した酵母 1 白金耳を 10 ml 滅菌済み生理食塩水にて懸濁し、懸濁液 1 ml を 500 ml の滅菌済み 1 %スクロース MY 液体培地（pH 6.6）に加え、30 °C、150 rpm、60~72 時間振とう培養した。培養後、遠心分離（14,170×g）を繰り返し行い、酵母湿菌体を回収し、重量測定を行い、得られた菌体量を比較した。

2.2.6.2 選抜した菌株による生地発酵試験

選抜する酵母は、中華まんの生地を発酵させるためのものであり、小麦粉生地进行膨化させる必要がある。日本イースト工業会・パン酵母試験法を参考にして生地进行発酵させ、膨化度合いを確認した [29]。発酵試験用の小麦粉生地は、表 2-2 の配合にて、小型ミキサー（KitchenAid 社製 KSM150）により捏ね上げた。小麦粉は、日清製粉「桔梗（中力粉）」、

ベーキングパウダーは、大宮糧食工業「BP-焼きミョウバンフリー」を使用した。初めにラードを除く材料をミキシングボウルに入れ、フラットビーターで10分間低速（速度調節レバー2）で捏ねた。その後、ラードを加え、中速（速度調節レバー3）7分間、高速（速度調節レバー4）で3分間捏ねた。その際、生地の状態を観察し、グルテンの形成（薄く伸ばしても切れず、反対側が透けて見える状態）により終点を確認した。捏ね上げられた生地は、内径74 mmの底無しのメスシリンダーに入れ、下部にシャーレを置き平らになる様に押し込み、30℃の恒温機にて120分間発酵した。発酵後、膨らんだ生地の上部にあるスケールを読み取った。対照区として、市販酵母（イースト FG, カネカ）を使用した。

2.2.7 走査型電子顕微鏡観察

採取した菌株が酵母であることをさらに確認するため、形状を走査型電子顕微鏡で確認した。酵母をMY培地で培養した細胞について、試料台の上に載せ、試料台ごとデシケータ内で48時間乾燥した後、オスミウムコーター（Neoc, メイワフォーシス）により導電コーティングしたうえで、走査型電子顕微鏡Hitachi S-4000にて撮影した。撮影は三重大学電子顕微鏡センターに依頼した。

2.3 結果

2.3.1 試料の収集と菌株の単離

三重県内各地の果実、野菜、花、樹液の検体から、MY寒天培地上でコロニーを形成した281株の酵母と推定される菌を単離することができ、No. 1~281として以下の実験に用いた。

果実表面や樹液から高い頻度で酵母と推定される菌株を得ることができ、特にコナラの樹液からは多くの菌株が分離された。

2.3.2 単離した菌株の発酵試験と光学顕微鏡観察による確認

選抜する野生酵母は、中華まん生地を発酵によって膨化させるために炭酸ガスを発生させる必要がある。また、中華まん生地には糖としてスクロースを使用しており、単離した野生酵母について、炭素源として、スクロースを用いて炭酸ガス発生能を調べた。

単離した281株について、MY液体培地（炭素源1%スクロース）を用いた発酵試験で

炭酸ガス発生能を調べたところ、Dhrum 管内で炭酸ガスを発生した菌株は、281 株中 27 株のみであった。また、炭素源としてグルコースを使用した場合にのみ、炭酸ガスを発生させる菌株もあった。しかしながら、中華まんの生地の主な炭素源はスクロースであるため、これらのグルコースのみ発酵した分離株は候補から除外した。結果として、スクロース発酵性の 27 株を選抜菌株とし、採取場所などを、表 2-3 にまとめた。これらの菌の細胞を光学顕微鏡（400 倍、Olympus BX 51）で観察し、その一部を顕微鏡像として、図 2-1 に示した。これらの菌株細胞はいずれも楕円形であり、図中に矢印で示したように、出芽により増殖することが推定でき、酵母の形態を有していることを確認した。

2.3.3 選抜した菌株の ITS 領域の塩基配列の解析

選抜した菌株の属種を決定するために、バーコード領域と呼ばれる ITS 領域の塩基配列を決定して近縁種の配列と比較し、98.41 %以上の相同性を有することで、どの種に属するか判定した [30]。ITS5 と ITS4 のプライマーを用いて PCR を行い、増幅した DNA 断片の塩基配列を決定した。決定した配列の相同性から菌種を判定した結果を表 2-4 に示した。菌株 No. 1, 2, 3, 4, 29, 31, 35, 40 について同じ塩基配列の 517 塩基が増幅された。相同性の検索を行ったところ、*Hanseniaspora uravum* CBS2585 株と 100 %一致しており、これらは、*Hanseniaspora uvarum* であると判定した。菌株 No. 9 と 195 については、同じ塩基配列の 386 塩基が増幅され、相同性検索で、*Groenewaldozyma salmanticensis* CBS5121 株と 99.7 %一致していた。菌株 No. 41 から得られた塩基配列は 243 塩基で、*Metschnikowia* sp. 3-TS-2020 株と 99.6 %一致し、菌株 No. 62 から得られ配列は 242 塩基で、*Metschnikowia rancensis* UCDFST:11-201 株と 100 %一致した。菌株 No. 172, 174, 175, 204 から得られた塩基配列は 808 塩基で同じで、*Saccharomyces cerevisiae* LL2012_040 株と 100 %一致していた。菌株 No. 178 と 187 の塩基配列も 454 塩基で一致しており、*Hanseniaspora vineae* CBS2827 株と 99.8 %一致していた。菌株 No. 179, 190, 192, 202, 203 から得られた塩基配列も 638 塩基で一致しており、*Lachancea fermentati* CBS12068 株と 100 %一致していた。菌株 278, 279, 280 から得られた塩基配列も 346 塩基で一致しており、*Candida intermedia* CNRMA9.237 株と 100 %一致していた。

これらのうち *Candida* 属、*Groenewaldozyma* 属、*Metschnikowia* 属の菌株については、食用に利用する酵母としての報告はなく、*Candida* 属については病原菌としての報告 [31] もあることから、選抜酵母の候補から除外した。

また、*Hanseinaspora* 属の菌株については、スクロースに対する資化性を持たないという報告があり [32, 33], 候補から外したが、食用に利用した報告があることから、比較のために一部菌株を候補に残した。

決定した配列および相同性検索のアライメント結果については、参考資料 2-1-1~8 として添付した。

2.3.4 選抜し同定した酵母の発酵（炭酸ガス発生）試験

選抜した酵母 (No. 178, 179, 187, 190, 192, 202, 203, 204) の糖質の資化性を炭酸ガス発生能で調べた。異なる炭素源を基質として培養し、炭酸ガスの発生状況を調べた結果を表 2-5 に示した。炭酸ガス発生の程度は、Dhrum 管内に溜まる程度の場合を+, Dhrum 管内から溢れ出す場合を++とした。対照とした市販酵母 (イースト FG, カネカ) は、グルコース, スクロース, マルトースで, 24 時間後に炭酸ガスの発生が見られ, 特にグルコースとマルトースで多く発生した。一方, 選抜した菌株では, 菌株 No. 187 以外の菌株では, グルコースとスクロースで炭酸ガスの発生が見られた。菌株 No. 204 は, グルコースとスクロースで, 特に多くの炭酸ガスが発生したが, マルトースでは炭酸ガスは発生しなかった。菌株 No. 178 は, スクロースでは, 48 時間培養でようやく炭酸ガスの発生が見られたが, マルトースでは炭酸ガスは発生しなかった。菌株 No. 179 は, スクロースとマルトースで, 48 時間培養でようやく炭酸ガスの発生が見られた。菌株 No. 190, 192, 202, 203 は, マルトースで, 48 時間培養でようやく炭酸ガスの発生が見られた。菌株 No. 187 は, グルコースで炭酸ガスの発生が見られたものの, それ以外の基質においては, 炭酸ガスの発生が見られなかった。これらの結果により, 菌株によって糖質の資化性が異なることが確認できた。

また, 選抜した酵母について, 中華まん生地の炭素源として用いられるスクロースで発酵させた際に発生する炭酸ガス量を比較した。発酵によって発生した炭酸ガスが空気中に放出されることで培養液の重量が軽くなると考え, 菌を接種していない MY 液体培地 (炭素源 1.0 % スクロース, 10 ml) を対照とし, 発酵による培地の重量の減少量を, 炭酸ガスの発生量とみなした [図 2-2]。菌株 No. 204 は, 他の分離株よりも高い炭酸ガス発生量を示し, 菌株 No. 190 は, 菌株 No. 204 に近い発酵能力を示すことがわかった。菌株 No. 178 は, MY 液体培地 (炭素源 1.0 % スクロース) による培養で, 十分に炭酸ガスを発生することができなかった。

2.3.5 酵母の生地発酵試験

2.3.5.1 選抜した酵母の培養

生地発酵テストには大量の酵母が必要になるため、培養により増菌させる必要があり、効率よく増殖するかどうかも応用的側面から重要である。生地発酵の試験では、500 ml のフラスコ培養を行い、遠心分離により湿菌体を回収した。各菌株の湿菌体の回収量を、表 2-6 に示した。菌株 No. 179, 190, 192, 202, 203, 204 については、市販酵母（イースト FG）を超える（108～119 %）湿菌体を回収することができた。一方、菌株 No. 178 においては、菌体湿収量が 83.7%と市販酵母（イースト FG）に比べて若干劣っていたが、選抜した酵母はどれも、MY 液体培地（炭素源 1 % スクロース）による好気培養により、生地の発酵試験に使用できる量の菌体を増殖できることがわかった。

2.3.5.2 選抜し同定した酵母を用いた生地の発酵試験および最終選抜

スクロースを炭素源として、炭酸ガス発生能が良好であった選抜酵母による生地発酵能力を、生地の膨化能で判定した（図 2-3）。菌株 No. 178 は、MY 液体培地（炭素源 1 % スクロース）による培養において炭酸ガス発生能力が低いにもかかわらず、良好な生地発酵を示した。これは、液体培地発酵能力が膨化能として判定する生地発酵能力を必ずしも反映していないことを示唆している。この理由については後の項で考察するが、スクロースを炭素源として生地をつくる場合には、液体培地での炭酸ガス発生試験はスクリーニングには有効であるが、グルテンの粘弾性に影響を与える代謝物などが影響する場合も考えられ、菌株の小麦粉生地の発酵能を評価するためには、最終的には、酵母を実際に小麦粉生地に入れた発酵試験が必要である。

菌株 No. 190 は、他の菌種より発酵速度が遅いものの、最終的（120 分後）に市販酵母（イースト FG）と比較して遜色ない膨化能を示した。また、菌株 No. 178 により膨化した小麦粉生地は表面が凸凹していた。菌株 No. 204 は、MY 液体培地（炭素源 1 % スクロース）による培養において炭酸ガス発生能力が最も高かったが、生地膨化能がほとんどなかった。菌株 No. 178 の結果とは真逆であったが、この場合も液体培地発酵能力が生地発酵能力を反映していないことを示す結果となった。生地の発酵試験で、十分な膨化が見られたのは、菌株 No. 178 および菌株 No. 190 であった。

生地の膨化能において、菌株 No. 178 は、市販酵母（イースト FG）に勝る結果であるが、

2.3.5.1 の結果から安定した大量培養が難しいことが懸念材料となった。また、膨化した生地表面が凸凹していることから生地に何らかの影響を与えていると考え、生地表面が滑らかな菌株 No. 190 を最終選抜株とした。

最終選抜株とした菌株 No. 190 および 市販酵母（イースト FG）の生地の膨化能を比較したところ、生地発酵力には若干の差異があり、菌株 No. 190 による生地発酵においては、膨化能を指標とした発酵速度が少し遅いことがわかった(図 2-3)。

2.3.6 最終選抜酵母の系統解析および国際 DNA データベースへの登録

菌株 No. 190 の ITS 領域について ITS4 及び ITS5 による増幅域を、それぞれのプライマーで再度塩基配列を決定し、さらに ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 を含む領域の塩基配列を決定した。決定した配列の全長は 651 塩基であり、BLAST アルゴリズムでの相同検索で塩基配列が 100 %一致したものは、*Lachancea fermentati*であった。とくに真菌類のカルチャーコレクションであるアメリカ農務省 NRRL に登録されている *L. fermentati* NRRL Y-1559 株、並びに、Westerdijk Institute (オランダ) に登録されている *L. fermentati* CBS797 株、CBS12066 株、CBS12067 株、CBS12068 株などの基準菌株と 100 %の一致をしており、典型的な *L. fermentati*であると推定した [図 2-4]。また、*L. fermentati*以外の *Lachancea* 属の他の種と、食品で利用されるイースト FG などが属する *Saccharomyces* 属との相同性について、表 2-7 にまとめた。*Lachancea* 属は *Saccharomyces* 属の近縁の属と考えられているが、*L. fermentati*は、他の *Lachancea* 属との相同性が高く、*Saccharomyces* 属とも近いものの、系統的に異なることを示している。

これらことから、本菌を *L. fermentati* NM73 株と命名し、その ITS 配列を国際 DNA データベースに登録し、アクセッションナンバー LC716519 を与えられた。

最終選抜した *L. fermentati* NM73 株について走査型電子顕微鏡により細胞形態の観察を行ったところ、やや細長い形態の酵母で、先端部分より出芽する酵母であることが分かった。この形態は、これまでに知られている *Lachancea* 属酵母の形態と合致していた [34, 図 2-5 A]。*Lachancea* 属には、フロックを形成できるものがあることが知られており [35]、図 2-5 B に示した様に、菌体が集団となるような形態も観察された。

2.4 考察

本章では、中華まん生地の発酵に適した野生酵母の探索を行うために、植物試料から、281 株の酵母と推定される菌株を単離することができた。生地の発酵には、炭酸ガスを発生することが必要となるため、液体培地において炭酸ガス発生についてスクリーニングし、主炭素源としてスクロースに絞った場合、27 株のみに炭酸ガスの発生が認められた [表 2-3]。特に中華まんの生地発酵に野生酵母を用いる研究の手始めでもあり、生地発酵の主炭素源として一般的なスクロースを使用することにし、まず、上記 27 株について rDNA の ITS 領域の塩基配列を調べることで酵母属種の簡易同定を行った。菌株の選抜について、生地発酵の主炭素源として一般に用いられ想定されるスクロースによる発酵での炭酸ガス発生量、実用面を考え液体培養で効率的に菌体量が得られること、実際に生地を発酵させた場合の膨化能について選抜を行った結果、*Saccharomyces cerevisiae* と推定された No. 204 株を除いて、市販酵母（イースト FG）と遜色ない生地発酵（膨化）能を有する菌株が採取できた [図 2-3]。

新しい生地の開発過程で将来的にスクロース以外の糖を炭素源として使用する可能性を考慮して、異なる炭素源による炭酸ガス発生を検討した。選抜した酵母についてグルコースおよびマルトースで炭酸ガス発生能を調べた結果、炭素源の違いで炭酸ガス発生能が異なることが確認できたが、今後の酵母のスクリーニング、選抜過程等でこの点も留意する必要がある [表 2-5]。

液体培養での炭酸ガス発生量と実際の生地の発酵での膨化の程度の関係が、必ずしも一致しない結果が得られた [図 2-2, 2-3]。菌株によっては、液体培養で炭酸ガスを多く発生しても生地での発酵では、効率的に炭酸ガスを発生できないことも考えられ、この場合には、今回用いたスクリーニング法自体を見直す必要がある。一方で、発酵による生地の膨化は、主として生地に含まれるグルテンの炭酸ガス保持能によると考えられるが、これについては、生地に含まれる他の成分の影響を考える必要がある。つまり、炭酸ガスが発生していても生地に保持されない可能性、あるいは、生地を効率よく膨化できない可能性も考えられる。2.3.5.2 で述べたように、実際、生地が膨化しても生地表面が凸凹である試料も観察され、炭酸ガスが生地から不均一に抜けることなどが原因と考えられる。

また、第 3 章で示すように、生地の発酵過程でアルコールや有機酸等の様々な代謝物が生産され、これらが生地の膨化、グルテンの物性などに影響する可能性が考えられる。生

地発酵前後の炭酸ガス発生量や、生地発酵で生産される代謝産物の種類や量が、生地の粘弾性などの物性などにどのような影響を与えるのか調べる必要がある。

酵母種の簡易同定は、rDNA 領域の塩基配列の相同性を利用した。酵母が属する Fungi 界 Ascomycota 門において、信頼性の高い菌種の同定方法として、rRNA シストロンの ITS 領域の塩基配列が適している [27, 28]。実際に ITS 領域の配列は、国際 DNA データベース上に豊富にあること、また細菌ではリボソームの小サブユニット (16S rRNA) 配列が利用されているが、糸状菌の 18S rRNA 配列では、十分に詳細な属種のバラエティが得られてないことなどの理由で、ITS 領域の配列比較が菌種同定に適している [27, 28]。ITS 領域の塩基配列の相同性の比較により、従来の中華まん生地に用いられている *Saccharomyces* 科の *Saccharomyces* 属、*Lachancea* 属と *Hanseniaspora* 属に属する菌株を選抜した。

ただ、*Hanseniaspora* 属の酵母は、液体培地での発酵性が *Lachancea* 属に比べて悪く、培養において回収できる湿菌体量が少ないことと [表 2-6]、生地発酵の際に生地の表面が凸凹していたことから、No. 190 菌株 (単離した複数の *L. fermentati* 菌株の中で、発酵力、回収量、安定性が最も良かったもの) を最終選抜酵母とした。

L. fermentati は、以前、*Zygosaccharomyces* 属に属していたが、2003 年に提案された *Lachancea* 属に再分類された酵母の種である [36]。現状で、*Lachancea* 属、*Zygosaccharomyces* 属、*Saccharomyces* 属、*Hanseniaspora* 属は、いずれも *Saccharomyces* 科の属である。クラフトビールにおける地元産酵母の利用を目的とした野生酵母を単離した研究においても、*Lachancea* 属や *Hanseniaspora* 属の酵母の単離が報告されている [20, 26]。

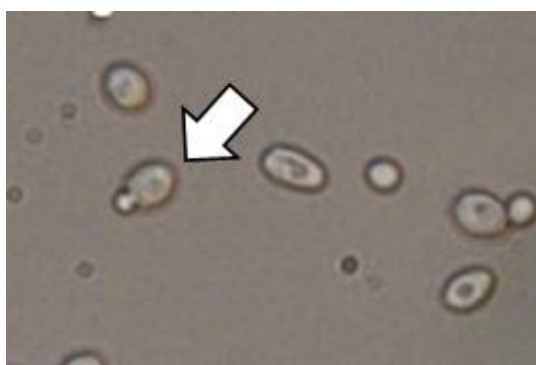
菌株 No. 190 は、*L. fermentati* の多くの基準菌株と ITS 領域の配列が 100 %一致していた他、アメリカのヨーグルト工場で採取された *L. fermentati* E20626 (アクセシオンナンバー MK267548.1)、愛知県内で採取されたクワガタムシから分離された *Lachancea* sp. とも 100 %一致していた (アクセシオンナンバー LC661440.1)。

L. fermentati は、これまで、ブドウ果汁などから主に単離されており、その他にも植物の葉、木の皮、樹液などから単離された実績がある [35, 37, 38]。また、ワインの醸造においては、ブドウ果汁の発酵速度が *Saccharomyces* 属に比べて早いことが知られているが、香気成分については、株間に大きな差があり、イソアミルアルコールなどの特定の成分を多く作るものとそうでないものがあると報告されている [39]。また調べた範囲では、これまでに中華まんの生地発酵に *Lachancea* 属の酵母を使用した事例を見つけることができなかったため、新規性のある中華まん生地の開発に繋がる可能性があると考え、選抜の

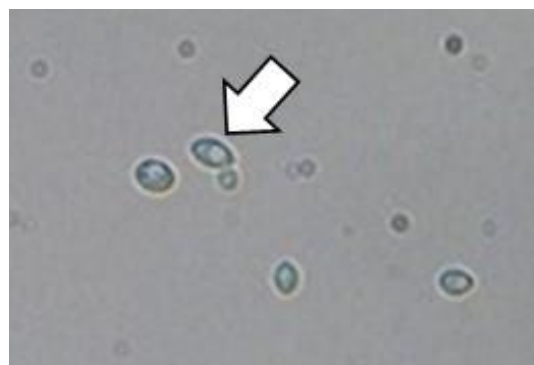
候補とした。 *Lachancea* 属では、その発酵特性が、種よりも株に依存するとの報告 [39] があるので、選抜した酵母について、第 3 章では、中華まん生地への活用を検討するために、その特性を調べることにした。

図

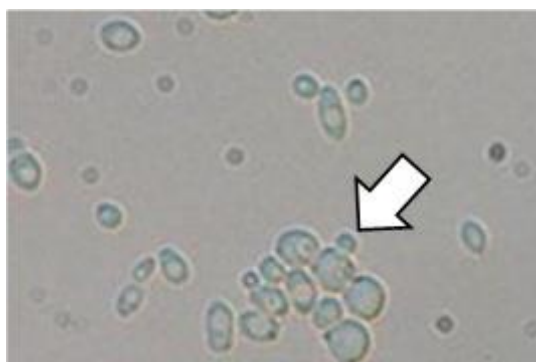
菌株 No. 178



菌株 No. 187



菌株 No. 190



菌株 No. 204

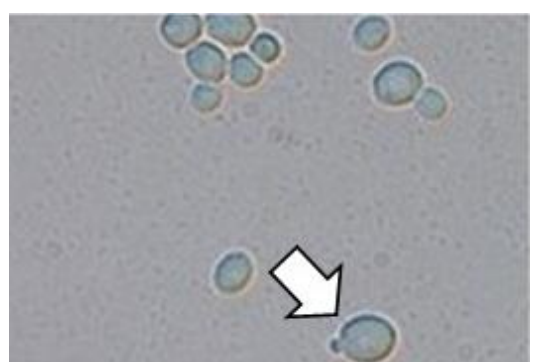


図 2-1 選抜した酵母細胞の顕微鏡画像 (400 倍, Olympus BX51)

矢印で示した箇所に、「出芽」をしているところが確認でき、酵母の特徴を有している。

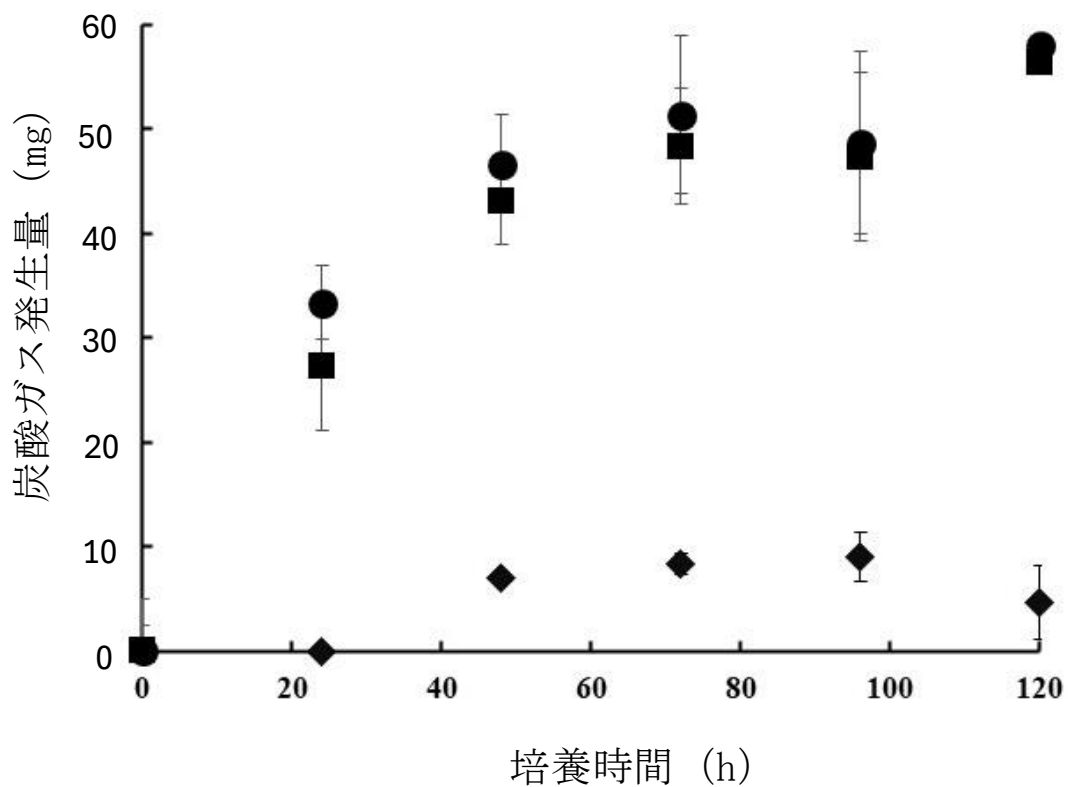


図 2-2 選抜した酵母の炭酸ガス発生量試験

● : 菌株 No. 204, ■ : 菌株 No. 190, ◆ : 菌株 No. 178

培養前後の培養液の重量の差を炭酸ガス発生量として示した.

数値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す.

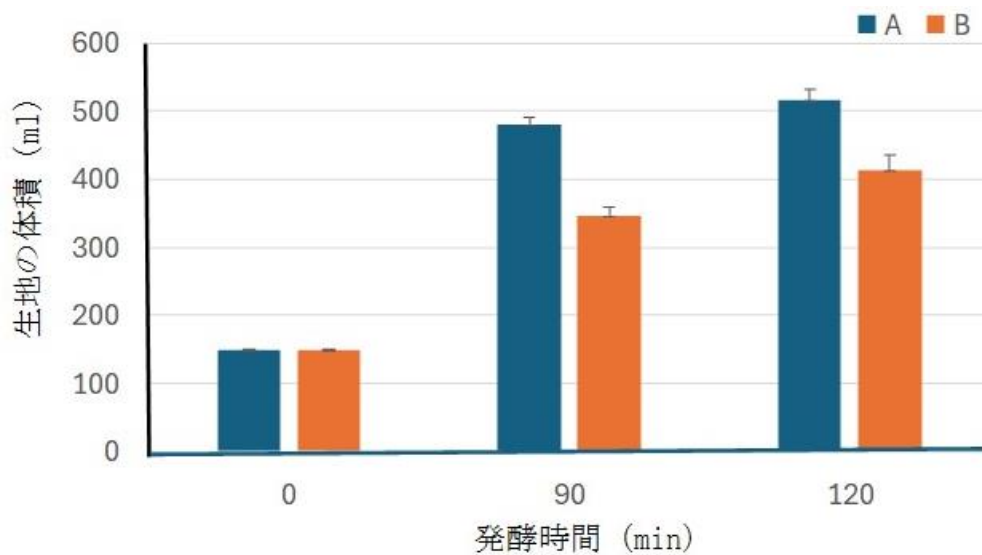


図 2-3 小麦粉生地の発酵に伴う膨化

選抜した酵母 NO. 190 株および市販酵母（イースト FG）を使った小麦粉生地を 30℃で発酵させた際の膨化状態を比較した。

生地の体積について、メスシリンダーの中での膨化状態を読み取った結果であり、メスシリンダーの目盛の単位から ml とした。数値は平均値±標準偏差（n=3）を示す。

A：市販酵母（イースト FG）による生地発酵テスト（膨化状態）

B：菌株 No. 190 による生地発酵テスト（膨化状態）

NM73	33	AAGAAATTGTTTAGAGCAGCCGGGAAAGGTCAGACGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCGAA	92
Y1559	1	AAGAAATTGTTTAGAGCAGCCGGGAAAGGTCAGACGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCGAA	60
NM73	93	GATACTTTCTGTTAACGACTGCTCTGCTACACACACTTTGGAGTAGTTTTTACAACA	152
Y1559	61	GATACTTTCTGTTAACGACTGCTCTGCTACACACACTTTGGAGTAGTTTTTACAACA	120
NM73	153	CTTCTTCTTTGGGCTTCGGCCAGAGGTTACAAACACAAACAACTTTTGTATTATATCAT	212
Y1559	121	CTTCTTCTTTGGGCTTCGGCCAGAGGTTACAAACACAAACAACTTTTGTATTATATCAT	180
NM73	213	AGTCAAGAATTTTTATTAGAAAAAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT	272
Y1559	181	AGTCAAGAATTTTTATTAGAAAAAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTT	240
NM73	273	CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG	332
Y1559	241	CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTG	300
NM73	333	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTT	392
Y1559	301	AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGAGGGCATGCCTGTT	360
NM73	393	GAGCGTCATTTCTTCTCAAACCTTAGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTCTAGGGTT	452
Y1559	361	GAGCGTCATTTCTTCTCAAACCTTAGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTCTAGGGTT	420
NM73	453	AACTTGAAAATGCTGGCCATCTGGCTGTTGCTGGCTGAGGCTTTAGTCCAGTCTGCTGAT	512
Y1559	421	AACTTGAAAATGCTGGCCATCTGGCTGTTGCTGGCTGAGGCTTTAGTCCAGTCTGCTGAT	480
NM73	513	ACTCTGCGTATTAGGTTTTACCAACTCGTGGGGCTTGAGCGGACGCTACAAAGACTTTT	572
Y1559	481	ACTCTGCGTATTAGGTTTTACCAACTCGTGGGGCTTGAGCGGACGCTACAAAGACTTTT	540
NM73	573	GCTAAAAGTACAGACAACCTGGCGAACAGTATTCACTAAGT	613
Y1559	541	GCTAAAAGTACAGACAACCTGGCGAACAGTATTCACTAAGT	581

図 2-4 *Lachancea fermentati* NM73 株の ITS 領域の配列

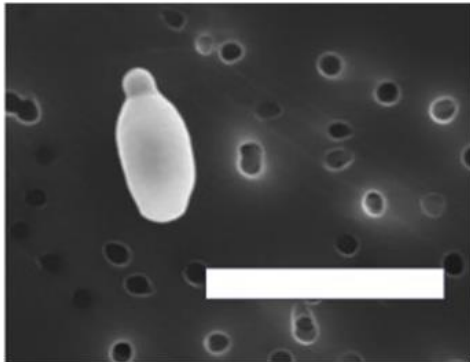
および *Lachancea fermentati* Y1559 株とのアライメント

Lachancea fermentati NM73: アクセション No. LC716519. 1

Lachancea fermentati Y1559: アクセション No. NR130666. 1

青字の部分は、5.8S rRNA の配列を示した。

A



B

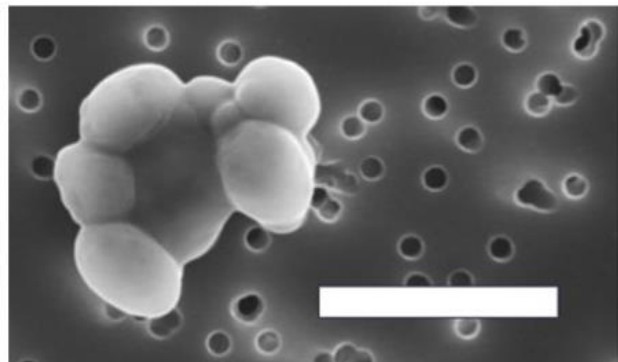


図 2-5 *L. fermentati* NM73 株の電子顕微鏡写真 (5,000 倍, 走査型電子顕微鏡 Hitachi S-4000)

A: やや細長い形態で, 先端部分より出芽している.

B: 菌体が集団となるような形態 (フロックを形成)

※白いスケールバーは $6\mu\text{m}$ を示す.

表

表 2-1 MY 培地組成

培地材料		液体培地		寒天培地	
		2%グルコース	1%スクロース	2%グルコース	2%スクロース
麦芽エキス (malt extract)	(%)	0.3	0.3	0.3	0.3
酵母エキス (yeast extract)	(%)	0.3	0.3	0.3	0.3
ポリペプトン (polypeptone)	(%)	0.5	0.5	0.5	0.5
グルコース (glucose)	(%)	2.0	—	2.0	—
スクロース (sucrose)	(%)	—	1.0	—	2.0
寒天 (agar)	(%)	—	—	2.0	2.0

表 2-2 発酵試験用小麦粉生地材料組成

原料	配合量 (g)
小麦粉 (中力粉・桔梗／日清製粉)	100.0
イースト (イーストFG／カネカ)	8.0
ベーキングパウダー (BP-焼きミョウバンフリー／大宮糧食工業)	0.6
食塩	1.3
砂糖	15.0
蒸留水	40.0
ラード	2.5

表 2-3 発酵性のあった菌株および採取試料, 採取場所

酵母 No.	採取試料	採取場所
172, 173, 174, 178, 179, 187, 190, 192, 195, 202, 203, 204	コナラの樹皮	三重県津市白山町・山林
61, 62	野生の花（ピンク色, 品種不明）	三重県津市白山町・山林
278, 279, 280	次郎柿	三重県津市白山町
9	野生の花（白色, 品種不明）	三重県津市白山町・山林
41	野生の花（黄色, 品種不明）	三重県伊勢市横輪町
1, 2, 3, 4	ぶどう（ピオーネ）	三重県名張市、青蓮寺湖周辺
29, 31, 35, 40	干し柿	三重県多気郡明和町

表 2-4 単離した酵母と最も塩基配列の相同性の高い酵母および相同性

酵母 No.	最も相同性の高い菌種	塩基配列の相同性 (%)	アクセシオンNo.
1, 2, 3, 4, 29, 31, 35, 40	<i>Hanseniaspora uvarum</i> CBS 2585	100.0	KY103571.1
9, 195	<i>Groenewaldozyma salmanticensis</i> CBS 51	99.7	KP250832.1
41	<i>Metschnikowia</i> sp. 3-TS-2020	99.6	LC710258.1
61, 62	<i>Metschnikowia rancensis</i> UCDFST:11-201	100.0	MH595380.1
172, 174, 175, 204	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LL2013_040	100.0	CP125425.1
178, 187	<i>Hanseniaspora vineae</i> CBS 2827	99.8	KY103581.1
179, 190, 192, 202, 203	<i>Lachancea fermentati</i> CBS 12068	100.0	KY103960.1
278, 279, 280	<i>Candida intermedia</i> CNRMA9.237	100.0	KP131721.1

表 2-5 単離した酵母の基質利用性と炭酸ガス発生

酵母No.	培養時間	基質として用いた糖類			
		グルコース	スクロース	マルトース	でんぷん (溶性)
市販酵母 (イーストFG)	24h	++	+	++	-
	48h	++	+	++	-
178	24h	+	-	-	-
	48h	+	+	-	-
179	24h	+	-	-	-
	48h	+	+	+	-
187	24h	+	-	-	-
	48h	+	-	-	-
190	24h	+	+	-	-
	48h	+	+	+	-
192	24h	+	-	-	-
	48h	+	+	+	-
202	24h	+	+	-	-
	48h	+	+	+	-
203	24h	+	+	-	-
	48h	+	+	+	-
204	24h	++	++	-	-
	48h	++	++	-	-

++：炭酸ガス発生多い (Durham 管に炭酸ガスが溜まって溢れ出した状態)

＋：炭酸ガス発生あり (Durham 管に炭酸ガスが溜まっている状態)

－：炭酸ガス発生なし (Durham 管に炭酸ガスが全く溜まっていない状態)

表 2-6 選抜した酵母の培養後得られた菌体湿重量

酵母 No.	収量 (g)
市販酵母 (イーストFG)	9.8
178	8.2
179	11.0
190	10.6
192	11.7
202	11.0
203	11.7
204	10.7

MY液体培地 500ml から得られた菌体湿重量

表 2-7 選抜した *Lachancea fermentati* NM73 株と近縁種の塩基配列の相同性

酵母菌種	塩基配列の相同性 (%)	アクセシオンNo.
<i>Lachancea fermentati</i> NRRL Y-1559	100.0	NR_130666.1
<i>Lachancea nothofagi</i> CBS 11611	92.3	NR_155331.1
<i>Lachancea thermotolerans</i> NRRL Y-8284	92.2	NR_111334.1
<i>Lachancea meyersii</i> CBS 8951	91.9	NR_077162.1
<i>Lachancea waltii</i> NRRL Y-8285	90.8	NR_138205.1
<i>Lachancea kluyveri</i> CBS 12073	90.7	NR_138159.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1171	85.7	NR_111007.1

参考資料

#1	1	TGATTTGAGGTCAACTTGATGAATATTTAAAGCAACCCTTTGCCTAAGGTACGTTACCAT	60
KY103571	821	TGATTTGAGGTCAACTTGATGAATATTTAAAGCAACCCTTTGCCTAAGGTACGTTACCAT	762
#1	61	TTCCCTTGTAAGTAAAACGAATAAATCCATAAATACATCACAGCGAGAACAGCGTCTCC	120
KY103571	761	TTCCCTTGTAAGTAAAACGAATAAATCCATAAATACATCACAGCGAGAACAGCGTCTCC	702
#1	121	AAAGAAGCTAAGTGTTGAATTAATAAAGACTGAAACAGTCTCCAATTTCAAGCTAACCCCT	180
KY103571	701	AAAGAAGCTAAGTGTTGAATTAATAAAGACTGAAACAGTCTCCAATTTCAAGCTAACCCCT	642
#1	181	GAGTATCGCCACAACCAAAAAATAATAAATTATCTTTGAGAAGGAATGACGCTCAA	240
KY103571	641	GAGTATCGCCACAACCAAAAAATAATAAATTATCTTTGAGAAGGAATGACGCTCAA	582
#1	241	CAGGCATGCCCTGAGAATGCTCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATTCATGATTAC	300
KY103571	581	CAGGCATGCCCTGAGAATGCTCAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATTCATGATTAC	522
#1	301	GAGTATCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAAC	360
KY103571	521	GAGTATCTGCAATTCACATTACTTATCGCAATTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAAC	462
#1	361	CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTATTTTAAAATTTCCGTTAGGAATTTGGTT	420
KY103571	461	CAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATTATTTTAAAATTTCCGTTAGGAATTTGGTT	402
#1	421	TAGTTTAAAAAATTATAATAAAATAAAATTGTTTGTGTTGTTTTTGCCTTGAACTTT	480
KY103571	401	TAGTTTAAAAAATTATAATAAAATAAAATTGTTTGTGTTGTTTTTGCCTTGAACTTT	342
#1	481	CGATTCAAAGCAGAAAGAATTAATTAAGTAAAAA	517
KY103571	341	CGATTCAAAGCAGAAAGAATTAATTAAGTAAAAA	305

参考資料 2-1-1 菌株 No. 1 (酵母) と *Hanseniaspora uravum* CBS2585 株の ITS 領域との
アライメント

青文字は rRNA をコードしている配列

#9	1	TGATTTGAGGTCAAATAACATATTGTATGGGCGACAAAGTGAATACTAGAACACTTGC	60
KP250832	404	TGATTTGAGGTCAAATAACATATTGTATGGGCGACAAAGTGAATACTAGAACACTTGC	345
#9	61	CAATGCCTTTCAAGGAATGTGTACCATTCCCTCAACATAAAATAGAATTTTAAAGAAGAGAT	120
KP250832	344	CAATGCCTTTCAAGGAATGTGTACCATTCCCTCAACATAAAATAGAATTTTAAAGAAGAGAT	285
#9	121	ATAACACTCAAACAGGTATGCCTTCCGAAGGAAGGCGCAATGTGCGTTGAAAATTCGAT	180
KP250832	284	ATAACACTCAAACAGGTATGCCTTCCGAAGGAAGGCGCAATGTGCGTTGAAAATTCGAT	225
#9	181	GATCCACTGCAATTCACATTACATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAAC	240
KP250832	224	GATCCACTGCAATTCACATTACATATCGCGTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAAC	165
#9	241	CAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTTTAAGATTAACACTTGCAAAAAATTTCAAGGTTTGCT	300
KP250832	164	CAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTTTAAGATTAACACTTGCAAAAAATTTCAAGGTTTGCT	105
#9	301	GTTAAAAAATTTACACAAATAATGTTCACTGTAAAAAGAATAGATTCAATAATGATCCTT	360
KP250832	104	GTTAAAAAATTTACACAAATAATGTTCACTGTAAAAAGAATAGATTCAATAATGATCCTT	45
#9	361	CCGCAGGTTACCTACGAAACCTTG	386
KP250832	44	CCGCAGGTTACCTACGAAACCTTG	19

参考資料 2-1-2 酵母 No. 9 (酵母) と *Groenewaldozyma salmanticensis* CBS51 株とのア
ライメント

青文字は rRNA をコードしている配列, 赤文字が異なっている塩基

#41	1	TGAGGAAGGAGTAGTTGGTGTAAAACCTTATTCTACAGCCATTTGATATTTAGGGA	60
LC710258	316	TGAGGAAGGAGTAGTTGGTGTAAAACCTTATTCTACAGCCATTTGATATTTAGGGATCAAG	257
#41	61	ACCAAACCAAAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCATCCACGCATGCCTTGAGGAATACCTT	120
LC710258	256	ACCAAACCAAAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCATCCACGCATGCCTTGAGGAATACCTT	197
#41	121	AAGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATTCATGATTCACGTCTGCAAGTCATATTACGTATCG	180
LC710258	196	AAGGCGCAATGTGCGTTCAAAAATTCATGATTCACGTCTGCAAGTCATATTACGTATCG	137
#41	181	CAATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTTT	240
LC710258	136	CAATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTTT	77
#41	241	TTTT	244
LC710258	76	TTTT	73

参考資料 2-1-3 菌株 No. 41 (酵母) と *Metshnikowia* sp. 3-TS-2020 株とのアライメント
 青文字は rRNA をコードしている配列, 赤文字が異なっている塩基.

#62	1	TGAGGAAGTAGGGTAGGTTCTAAAACCTTATTCTAGTACCGTTGATATTTAGGGCCAAGA	60
MH595380	330	TGAGGAAGTAGGGTAGGTTCTAAAACCTTATTCTAGTACCGTTGATATTTAGGGCCAAGA	271
#62	61	CCAAACCAAAGGTTTGAGGGTAAATATCGCTCATTACGCATGCCTTGAGGAATACCTTA	120
MH595380	270	CCAAACCAAAGGTTTGAGGGTAAATATCGCTCATTACGCATGCCTTGAGGAATACCTTA	211
#62	121	AGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACGTCTGCAAGTCATATTACGTATCGC	180
MH595380	210	AGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACGTCTGCAAGTCATATTACGTATCGC	151
#62	181	AATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTTT	240
MH595380	150	AATTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTTT	91
#62	241	TT	242
MH595380	90	TT	89

参考資料 2-1-4 菌株 No. 62 (酵母) と *Groenewaldozyma salmanticensis* CBS51 株とのア
 ライメント

青文字は rRNA をコードしている配列

#172	1	TGATTTGAGGTCAAACCTTTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAAC	60
CP125425	557655	TGATTTGAGGTCAAACCTTTAAGAACATTGTTTCGCCTAGACGCTCTCTTCTTATCGATAAC	557714
#172	61	GTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGAGTTGGTAAACCTAAACGACCGT	120
CP125425	557715	GTTCCAATACGCTCAGTATAAAAAAGATTAGCCGAGTTGGTAAACCTAAACGACCGT	557774
#172	121	ACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAACATCCAATGA	180
CP125425	557775	ACTTGCATTATACCTCAAGCACGCAGAGAAACCTCTCTTTGGAAAAAAACATCCAATGA	557834
#172	181	AAAGGCCAGCAATTTCAAGTAACTCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGTTT	240
CP125425	557835	AAAGGCCAGCAATTTCAAGTAACTCAAAGAGTATCACTCACTACCAAACAGAATGTTT	557894
#172	241	GAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGT	300
CP125425	557895	GAGAAGGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGT	557954
#172	301	TCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCG	360
CP125425	557955	TCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCG	558014
#172	361	TTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATT	420
CP125425	558015	TTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTAATATTTTAAAATT	558074
#172	421	TCCAGTTACGAAAATTCCTGTTTTTGACAAAATTTAATGAATAAATAAAATTGTTTG	480
CP125425	558075	TCCAGTTACGAAAATTCCTGTTTTTGACAAAATTTAATGAATAAATAAAATTGTTTG	558134
#172	481	TTTGTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAA	540
CP125425	558135	TTTGTACCTCTGGGCCCGATTGCTCGAATGCCCAAAGAAAAAGTTGCAAAGATATGAA	558194
#172	541	AACTCCACAGTGTGTTGATTGAAACGGTTTTAATTGCTCCTATAACAAAAGCACAGAAAT	600
CP125425	558195	AACTCCACAGTGTGTTGATTGAAACGGTTTTAATTGCTCCTATAACAAAAGCACAGAAAT	558254
#172	601	CTCTCACCGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAA	660
CP125425	558255	CTCTCACCGTTTGAATAGCAAGAAAGAACTTACAAGCCTAGCAAGACCGCGCACTTAA	558314
#172	661	GCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGCTTCTTGCCAGTAAAAGCTCTCATGCT	720
CP125425	558315	GCGCAGGCCCGGCTGGACTCTCCATCTCTTGCTTCTTGCCAGTAAAAGCTCTCATGCT	558374
#172	721	CTTGCCAAAACAAAAAATCCATTTTCAAATTTAATAATTTCTTTAATGATCCTTCCGC	780
CP125425	558375	CTTGCCAAAACAAAAAATCCATTTTCAAATTTAATAATTTCTTTAATGATCCTTCCGC	558434
#172	781	AGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGA	808
CP125425	558435	AGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGA	558462

参考資料 2-1-5 菌株 No. 172 (酵母) と *Saccharomyces cerevisiae* LL2023_040 株とのア

ライメント

青文字は rRNA をコードしている配列

#178	1	TGATTTGAGGTCAAAC	TTTATGAATACTGTTGGCC	CAGCCAGCCCAGTGTGTC	TGAGGTT	60
KY103581	707	TGATTTGAGGTCAAAC	TTTATGAATACTGTTGGCC	CAGCCAGCCCAGTGTGTC	CGAGGTT	648
#178	61	GGGTGGACTGCAACTGC	AATAAGACGCGACAATGAA	AGTTGGTATGAATACCTAA	AATACA	120
KY103581	647	GGGTGGACTGCAACTGC	AATAAGACGCGACAATGAA	AGTTGGTATGAATACCTAA	AATACA	588
#178	121	TTGGTTACATCCTGCAC	AGACGCGAGTCCCCTCAG	AGAAGGGGCAGCCAAATGG	GCATA	180
KY103581	587	TTGGTTACATCCTGCAC	AGACGCGAGTCCCCTCAG	AGAAGGGGCAGCCAAATGG	GCATA	528
#178	181	GCATTTTCAAGTTAAC	CCTGTAACAGAGTATCACT	CACAACCAAAAACTGGGTT	TTTTGAG	240
KY103581	527	GCATTTTCAAGTTAAC	CCTGTAACAGAGTATCACT	CACAACCAAAAACTGGGTT	TTTTGAG	468
#178	241	AAGGAAATGACGCTCAA	ACAGGCATGCCCTCTGGA	ATACCAGAGGGCGCAATGT	GCGTTC	300
KY103581	467	AAGGAAATGACGCTCAA	ACAGGCATGCCCTCTGGA	ATACCAGAGGGCGCAATGT	GCGTTC	408
#178	301	AAAAATTC AATGATTCA	CGAGAATCTGCAATTCAC	ATTACTTATCGCAATTCG	TACGTT	360
KY103581	407	AAAAATTC AATGATTCA	CGAGAATCTGCAATTCAC	ATTACTTATCGCAATTCG	TACGTT	348
#178	361	CTTCATCGATGCGAGA	ACCAAGAGATCCGTTGTT	GAAAGTTTTAAAATATTT	ATTTCAA	420
KY103581	347	CTTCATCGATGCGAGA	ACCAAGAGATCCGTTGTT	GAAAGTTTTAAAATATTT	ATTTCAA	288
#178	421	TAGAAATTTCTTGATT	GTCTGTAATAAAAAAAAA		454	
KY103581	287	TAGAAATTTCTTGATT	GTCTGTAATAAAAAAAAA		254	

参考資料 2-1-6 菌株 No. 178 (酵母) と *Hanseniaspora vineae* CBS2827 株とのアライメント

青文字は rRNA をコードしている配列, 赤文字が異なっている塩基.

#179	1	TGATTTGAGGTCAA	60
KY103960	770	TTAGTGAATACTGTT	711
#179	61	TCTTTGTAGCGTCCGCTCAAGCCCCACGAGTTGGTAAAACCTAATACGCAGAGTATCAG	120
KY103960	710	TCTTTGTAGCGTCCGCTCAAGCCCCACGAGTTGGTAAAACCTAATACGCAGAGTATCAG	651
#179	121	CAGACTGGACTAAAGCCTCAGCCAGCAACAGCCAGATGGCCAGCATTTTCAAGTTAACCC	180
KY103960	650	CAGACTGGACTAAAGCCTCAGCCAGCAACAGCCAGATGGCCAGCATTTTCAAGTTAACCC	591
#179	181	TAGAAAGAGTATCACTCACTACCAAACCTAAGGTTTGAAGAAGAAATGACGCTCAAACA	240
KY103960	590	TAGAAAGAGTATCACTCACTACCAAACCTAAGGTTTGAAGAAGAAATGACGCTCAAACA	531
#179	241	GGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTACGCA	300
KY103960	530	GGCATGCCCTCTGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTACGCA	471
#179	301	AAATCTGCAATTCACAATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCA	360
KY103960	470	AAATCTGCAATTCACAATACTTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCA	411
#179	361	AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAATATTTTTTTCTAATGAAAAATTCTTGACTATGAT	420
KY103960	410	AGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGAATATTTTTTTCTAATGAAAAATTCTTGACTATGAT	351
#179	421	ATAATACAAAAGTTGTTTGTGTTTGTAACTCTGGGCCGAAGCCCAAAGAAGAAGTGTG	480
KY103960	350	ATAATACAAAAGTTGTTTGTGTTTGTAACTCTGGGCCGAAGCCCAAAGAAGAAGTGTG	291
#179	481	TAAAAAACTACTCCAAAGTGTGTGTGTAGCAGAGCAGTCGTTAACAGAAAGTATCTTCGG	540
KY103960	290	TAAAAAACTACTCCAAAGTGTGTGTGTGTAGCAGAGCAGTCGTTAACAGAAAGTATCTTCGG	231
#179	541	CCGCGCAATTAAGCGCAGGCGTCTGACCTTTCCCGGCTGCTCTAAACAATTTCTTTAATG	600
KY103960	230	CCGCGCAATTAAGCGCAGGCGTCTGACCTTTCCCGGCTGCTCTAAACAATTTCTTTAATG	171
#179	601	ATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGA	638
KY103960	170	ATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGA	133

参考資料 2-1-7 菌株 No. 179 (酵母) と *Lachancea fermentati* CBS12068 株とのアライメント

青文字は rRNA をコードしている配列

#279	1	TGATTTGAGGGCGA	60
KP131721	346	TTAAGAATAAAGTTGAAGTAACGTATTGCAACAACCTGTGATATTTTCGG	287
#279	61	AAGGCAACACCAAACCCGGGGTTTGAAGGGAGCCGACGCTCAAACAGGCATGCCTTGAG	120
KP131721	286	AAGGCAACACCAAACCCGGGGTTTGAAGGGAGCCGACGCTCAAACAGGCATGCCTTGAG	227
#279	121	GAATACCTCAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACGCTCTGCAAGTCATGAT	180
KP131721	226	GAATACCTCAAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTACGCTCTGCAAGTCATGAT	167
#279	181	ACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA	240
KP131721	166	ACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA	107
#279	241	GTTTTGATTTTTTTTAGGTTATTGAATATTAATGGTTATTAGTGTGTTGCTTCAAAAACAA	300
KP131721	106	GTTTTGATTTTTTTTAGGTTATTGAATATTAATGGTTATTAGTGTGTTGCTTCAAAAACAA	47
#279	301	TGTAATAAATTAATTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGA	346
KP131721	46	TGTAATAAATTAATTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGA	1

参考資料 2-1-8 菌株 No. 279 (酵母) と *Candida intermedia* CBRMA9.237 株とのアライメント

青文字は rRNA をコードしている配列

第3章 選抜した野生酵母の特性と中華まん生地への活用について

3.1 緒言

第2章において、三重県津市の山林に自生するコナラから採取した酵母から、小麦粉生地の膨化能を有する野生酵母を単離することができた。単離した野生酵母は、*Lachancea fermentati*に属する酵母であった。

*L. fermentati*は、中華まんへの応用例はないが、パンにおいて応用された事例がある。*S. cerevisiae*を使った全粒小麦パンでは、発酵可能なオリゴ糖、二糖類、単糖、ポリオールが残留しており、過敏性大腸炎において問題になっている。Ispiryanらは、環境から単離した96の分離酵母から、小麦生地での膨化を目安に、最終的に*L. fermentati*FST5.1株を選抜している。この菌は、消費されにくい全粒小麦に含まれるフルクタンと果糖を消費し、発酵品質は、*S. cerevisiae*と比較できるものであった[40]。また、古川は、単離した*L. fermentati*KPC1株を使用し、パン発酵を行っており、市販酵母に比べ増殖速度が遅く、エタノール生産性は低かったが、乳酸を発酵していることを報告している[41]。

ワインにおいては、*S. cerevisiae*が発酵の主体ではあるが、ぶどう果皮などから入る様々な酵母が発酵品質に影響することが知られている[35]。例えば、Porterらは、ぶどう品種ソービニオンブランから単離した*L. fermentati*Y515株で発酵したワインでは、イソブタノール、イソ酪酸、モノテルペンが多くなることを報告している[39]。また、クラフトビールでは、従来の乳酸菌添加によるサワービール発酵に代わり、乳酸発酵とアルコール発酵を同時に行うことができる野生酵母の探索が行われている[20, 26, 37]。Osburnらは、284の分離酵母のうち、白樺の樹皮から単離した*L. fermentati*WYP39株が、乳酸発酵とアルコール発酵が同時できる菌株の一つであると報告している[38]。Bellutらは、米国各地とオーストラリアのKombuchaより単離した*L. fermentati*の4株で、適度な酸度と残糖のある低アルコールビールの開発を行っている[34]。

本章においては、選抜した酵母(*L. fermentati* NM73株)により発酵した生地が市販酵母により発酵した生地と比べて、どのような特徴があるかを、中華まん生地に含まれる物質的側面から検討した。

生地の味や香りなどに関係することを考え、液体培養下でのアルコールや、*L.*

fermentati 特有と考えられる乳酸の生成量についても確認する。

さらに、本菌で発酵させて作った小麦粉生地成分分析(香氣成分および遊離アミノ酸、有機酸含有量)を行い、市販のパン酵母で作った小麦粉生地と比較することにより、本菌により発酵した小麦粉生地の特性を調査し、その特徴を考察する。

3.2 方法

3.2.1 アルコール発酵能の測定

スクロース濃度 2 %, 4 %, 8 % に調製した YP 液体培地 (酵母エキス 1.0 %, ポリペプトン 1.0 %, スクロース適宜, pH 6.6) を、各 10 ml を試験管に分注し滅菌した。選抜した酵母 (*L. fermentati* NM73 株) 1 白金耳を滅菌済み生理食塩水 10 ml にて懸濁し、懸濁液 100 μ l をスクロース濃度の違う YP 液体培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C, 120 時間、静置培養し、24 時間毎に生成したエタノール濃度を測定した。エタノール濃度の測定には、アルコメイト Type AL2 (簡易アルコール分析機・理研計器) を使用した。市販酵母 (イースト FG, カネカ) を対照とし、同様の試験を行い比較した。

3.2.2 乳酸発酵能の測定

YP 液体培地を、スクロース濃度 8 % に調製し、10 ml を試験管に分注し滅菌した。酵母 1 白金耳を滅菌済み生理食塩水 10 ml にて懸濁し、懸濁液 100 μ l をスクロース濃度 8 % の YP 液体培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C, 120 時間、静置培養し、24 時間毎に培地中の乳酸濃度を測定した。乳酸濃度の測定には、Lactate Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を使用し、マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイスジャパン SpectraMAX ABSPlus) により 450 nm の吸光度にて測定した。

3.2.3 中華まん生地の香氣成分分析

香氣成分については、2.2.6 と同様の方法で作った生地 (A: 市販酵母 (イースト FG) による発酵、及び B: 選抜した酵母による発酵、非加熱) を分析試料とした。

香氣成分の分析は、ヘッドスペースサンプラー (Agilent G1888) を装着したガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS: Agilent GC 6890N /MS 5975C) を用いて、外部標準法により実施した。生地 (非加熱) 1.0 g を 20 ml 容量のバイアル瓶に取り、90 $^{\circ}$ C で 30 分間保

持したのち、ヘッドスペースガス 1 ml を GC/MS に注入した。キャリアガスはヘリウム（流速 1.4ml/min）、ヘッドスペースのニードル温度は 160°C、トランスファー温度は 200°C、ヘッドスペースキャリアガス圧は 60 kPa、気化室温度は 220°C、イオン源温度は 240°C、インターフェース温度は 260°C とした。分析カラムは VF-WAXms（長さ 60 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.5 μ m, アジレント・テクノロジー株式会社）を用いた。カラムオープンの温度は、40°C で 3 分間保持した後、10°C/min で 260°C まで昇温させ、5 分間保持した。測定は SCAN モード測定ではマススペクトルを確認して定性し、SIM モード測定では外部標準法により定量した。各成分の測定イオン（定量イオン(m/z), 確認イオン(m/z)）は、イソアミルアルコール (55, 70), *n*-プロピルアルコール (59, 60), イソブチルアルコール (43, 74), フェネチルアルコール (91, 122), 酢酸エチル (43, 61), 酢酸イソアミル (43, 70), カプロン酸エチル (88, 99), カプリル酸エチル (88, 101), アセトイン (43, 45), 酢酸 (60, 43), イソ酪酸 (43, 73), *n*-酪酸 (60, 73), イソ吉草酸 (60, 87) とした。SCAN モード測定のスキャン範囲は m/z 29–200 とした。測定はそれぞれの試料で 3 回行い、平均値ならびに標準偏差を算出した。イオン化法は EI 法を用いた。

標準液の調製と検量線の作成は、以下の様に行った。各特級試薬を 0.500g 精秤し、特級エタノール（ナカライテスク）15ml にて溶解し、水で 50ml に定容し、1%の標準原液を作り、これを混合、希釈し、15vol%のエタノールを含むよう混合標準液を作成した。アルコール（イソアミルアルコール（富士フィルム和光純薬）、*n*-プロピルアルコール（富士フィルム和光純薬）、イソブチルアルコール（富士フィルム和光純薬）、フェネチルアルコール（富士フィルム和光純薬）と酢酸エチル（富士フィルム和光純薬）は、10, 50, 100, 500 mg/l, 酢酸イソアミル（富士フィルム和光純薬）、カプロン酸エチル（東京化成工業）とカプリル酸エチル（東京化成工業）は、1, 5, 10, 50 mg/l, アセトイン（東京化成工業）と酢酸（富士フィルム和光純薬）は、10, 50, 100, 500, 1000 mg/l, その他の有機酸（富士フィルム和光純薬、イソ酪酸のみナカライテスク）は、5, 10, 20, 50 mg/l の濃度に調整し、各濃度の混合標準液 100 μ l を 20ml 容量のバイアル瓶中で全量揮発させて試料と同様に分析し、検量線を作成した。試薬のアセトインについては、重合した 2 量体の結晶であったため、窒素下で 100°C に加熱し、解重合して使用した。尚、GC-MS による香気成分の定量は三重県工業研究所の支援のもと、実施した。

各試料の TIC は、図 3-1-1, 3-1-2, 定量した各香気成分のイオンスペクトルは、図 3-2-1~13 に示した。

3.2.4 中華まん生地の遊離アミノ酸分析

生地に含まれる遊離アミノ酸分析については、公定法（日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル）に従って行った。試料を細断後、試料と同量の 10 %スルホサリチル酸溶液を加えてミルで粉碎し、粉碎物約 12 g を精秤し、25 ml の 10 %スルホサリチル酸溶液を加え、20 分間混合した。水酸化ナトリウム溶液により pH 2.2 付近に調整し、クエン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.2）で 50 ml に定容し適宜希釈後、ろ紙（No. 1）〔東洋濾紙株式会社〕でろ過した。ろ過後の溶液をさらにメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過した。ろ液を試料溶液とし、アミノ酸混合標準液（富士フィルム和光純薬, Type H）を用い、アミノ酸自動分析装置により分析を行った。また、アミノ酸のうちトリプトファンについても、公定法（日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル）に従って行った。水で 50 ml に定容し、ろ過するところまでは他のアミノ酸と同じであるが、ろ過液のうち 5ml を全量ピペットで 10 mL 全量フラスコに分取し、水酸化ナトリウム溶液で微アルカリに調整後、水で 10 ml に定容し、メンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過した液を試験溶液とし、標準溶液（トリプトファン標準品 50 mg を精秤し、0.1 mol/l の水酸化ナトリウム溶液に溶解後、100 ml に定容し、水で 50 倍希釈；10 $\mu\text{g/ml}$ ）を用い、液体クロマトグラフィーにより分析を行った。分析は、日本食品分析センターに依頼した。

3.2.5 中華まん生地の有機酸分析

生地に含まれる有機酸分析については、公定法（日本食品標準成分表 2020 年版（八訂）分析マニュアル）に従って行った。試料 3~5 g を精秤し、5 ml の 5 %過塩素酸及び水約 25 ml を加えて 10 分間混合した後、水で 50 ml に定容した。定容後、ろ紙（No. 5B〔東洋濾紙株式会社〕）及びメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過した液を試料溶液とし、高速液体クロマトグラフィーにより分析を行った。標準溶液のうち、クエン酸標準溶液は、クエン酸三ナトリウム二水和物(特級)0.1531g を容量 100ml 全量フラスコに精秤し、水で定容した（1.0 mg/ml）。定容後、ろ紙（No. 5B〔東洋濾紙株式会社〕）及びメンブランフィルター（孔径 0.45 μm ）でろ過した液を 0.01, 0.1, 0.2 及び 0.5 mg/ml となるように水で希釈し調整した。また、それ以外の有機酸の標準溶液についても同様に調整した。分析は、日本食品分析センターに依頼した。

3.3 結果

3.3.1 エタノール生産性

L. fermentati NM73 株のエタノール生産性について、YP 液体培地に植菌し、30°Cで発酵させ、経時変化により検討した。炭素源としてスクロースを使用し、2, 4, および 8 %と濃度を変えて、エタノール濃度を測定したところ、どの濃度においても 48 時間後以降にエタノールが生成し、96 時間後にピークを迎えた。スクロース濃度を高めると、生産されたエタノールの濃度は増加し、8% 区で最もエタノール生産性が高く、エタノール濃度 4 %に達した。エタノール濃度は、基本的にスクロース濃度に依存していた。また、市販酵母（イースト FG）によるエタノール生産性は、本菌のエタノール生産性より若干高かった[図 3-3]。

3.3.2 乳酸生成量

本菌による YP 液体培地での乳酸の発生量を測定した。48 時間後以降に乳酸を生成し、120 時間後まで増え続けた [図 3-4]。一般的に *Lachancea* 属の酵母は、乳酸を生成することが知られており [34, 35, 37, 39]、本菌も同様の特性を示した。また、市販酵母（イースト FG）においては、乳酸の生成はほとんど見られなかった。

3.3.3 中華まん生地の評価

3.3.3.1 GC/MS による香気成分の分析結果

試作した中華まん生地の香りについては、GC/MS で検出された香気成分をヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析 (HS-GC/MS) 法により定量したところ、表 3-1 の結果を得た。

本菌 (*L. fermentati* NM73 株) により発酵させて作った中華まん生地と市販酵母 (イースト FG) により発酵させて作った中華まん生地の分析結果において、両者においてイソアミルアルコールが比較的多く含まれ、本菌におけるアセトインの含有量は少なかった。

一方で、市販酵母 (イースト FG) で発酵させた中華まん生地には、酸臭や発酵臭に由来する揮発性脂肪酸 (酢酸, イソ酪酸, *n*-酪酸, イソ吉草酸) が多く含まれ、イソアミルアルコールに由来する香り (果実の様な甘い香り) が阻害されるのではないかと推測した。

3.3.3.2 アミノ酸および有機酸の分析結果

中華まん生地に含まれる遊離アミノ酸 [表 3-2] および有機酸量を比較した [表 3-4]。その結果、必須アミノ酸の一つであるリジンが生地 100 g あたり 71 mg と、市販酵母（イースト FG）で発酵させた生地の約 8 倍量含まれていた。また、本菌を用いて発酵させた中華まん生地には、乳酸が多く、酢酸が少ない傾向にあった。

3.4 考察

L. fermentati の生地発酵の研究例は少ないが、ワインやビールなど液体発酵における性質の検討などの先行研究 [34, 35, 37, 39] がある。これらによると *Saccharomyces* 属の酵母と比べ、乳酸を生成することが大きな特徴であることが報告されており、クラフトビールにおいては、独特な特徴の一つになっている [34, 37]。

L. fermentati NM73 においても、液体培養では、乳酸が生成することを確認した [図 3-2]。一方、生地発酵させて作った中華まん生地の有機酸分析でも、対照区（市販酵母（イースト FG）で作った生地）と比較して乳酸が多く含まれ、本菌による乳酸生成が生地発酵においても検出された。このことは、糖の解糖において生じるピルビン酸が、*S. cerevisiae* では、エタノールに代謝されるのに対して、*L. fermentati* では、エタノールに代謝される他、一部が乳酸になっていることを示している [34]。これは、図 3-3 で示す発酵試験でエタノールの生成量が市販酵母（イースト FG）よりも少ないことと関連していると考えられる。

パンの製造において、乳酸菌を含むサワー種を使うことによりパンの日持ちを改善している例があり [42]、本菌の乳酸生成能力は、中華まんの生地に同様の効果を期待できる可能性がある。また中華まん生地発酵における乳酸産生は、味の面からも良い特性になる可能性があると考えた。*L. fermentati* を使った低アルコールビールの開発では、発酵後に残存した糖分と、この乳酸によりバランスの取れた製品ができるとの報告もあり [34]、乳酸の生成は、本菌の特徴の一つで、中華まん生地に乳酸が含まれるという新たな特性を付与する可能性が考えられる。

小麦粉生地の GC/MS の分析では、市販酵母（イースト FG）で発酵させて作った生地には、本菌で発酵させて作った生地よりも、オフフレーバーとされる香気成分として、酸臭や発酵臭のする酢酸、イソ酪酸、*n*-酪酸、イソ吉草酸 [43] がおよそ 2 倍量含まれていた。ま

た、市販酵母（イースト FG）および本菌を用いた生地には、両者ともに同程度のイソアミルアルコールが含まれていた。イソアミルアルコールは、果実様芳香の特徴香成分とされる高級アルコールであり、日本酒においては、酒らしい香りを下支えすると言われている [44]。本菌により発酵して作った生地については、市販酵母（イースト FG）で発酵させて作った生地よりもオフフレーバーが少ないことより、イソアミルアルコール由来の香りが感じやすいのかもしれない。こうした成分により、市販酵母（イースト FG）と比較し、甘い香りが立ち特徴のある香りを有する中華まんができる可能性がある。

発酵生地の遊離アミノ酸分析では、リジンが検出された。リジンは小麦タンパク質のアミノ酸スコアの中で、一番低くなっている [45]。パン酵母がリジンを生産するという報告はないが、液胞にリジンを多く蓄積するような酵母の育種研究は行われている [46]。本菌のリジン生産性については、興味深い分析結果ではあるが、遊離アミノ酸だけでなく、タンパク質由来のアミノ酸を含めて分析するなど、今後の詳細な研究が必要である。

発酵生地の有機酸分析では、乳酸を検出することができ、液体培養だけでなく、本菌が発酵した生地においても乳酸を生産していることが確認できた。

このような特徴のある香り成分と有機酸である乳酸が中華まんの生地で検出されたことは、本菌を使用した中華まん生地に、これまでの市販酵母にはない特性を提供することができる可能性を示した。もちろんこれらの特性が消費者に受け入れられるものかどうかは、今後の課題として、モニター調査等による確認が必要ではあるが、本研究において、野生酵母が、中華まんの生地にこれまででない特性を付与することに、活用できる可能性を示すことができた。

図

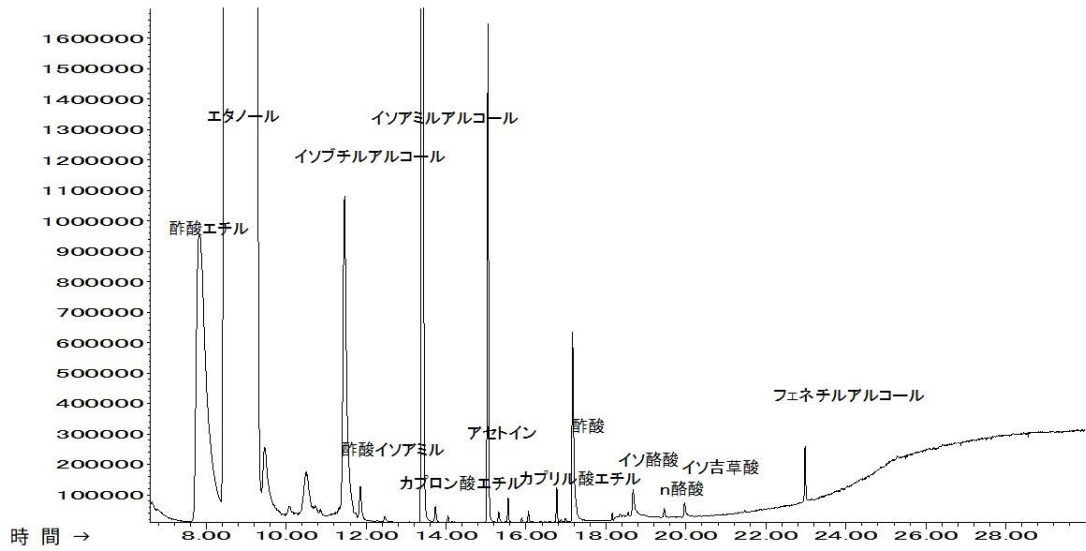


図 3-1-1 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム TIC (市販酵母 (イースト FG))

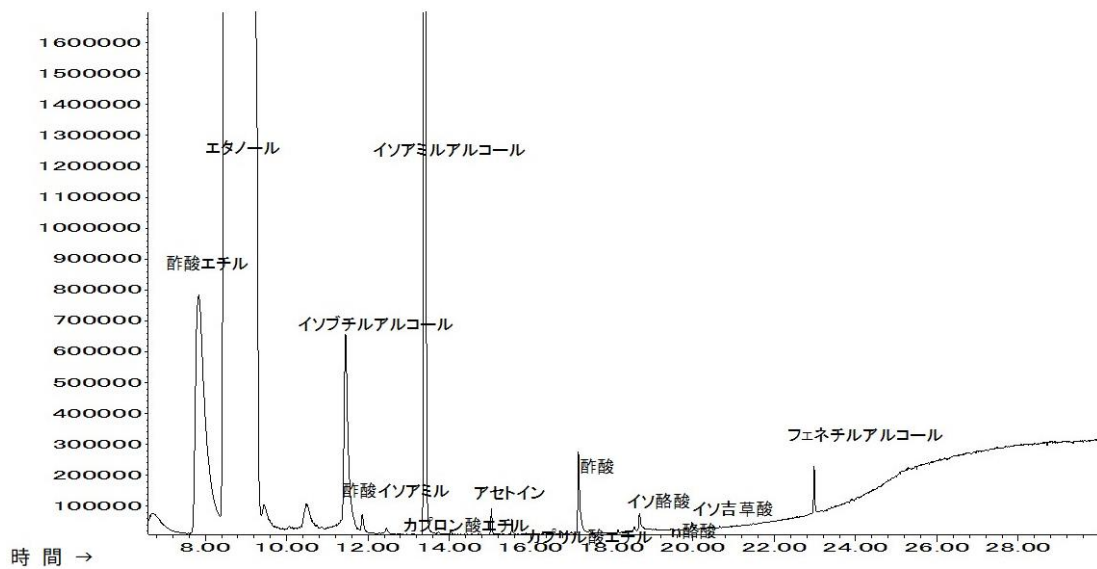


図 3-1-2 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム TIC (*Lachancea fermentati* NM73 株)

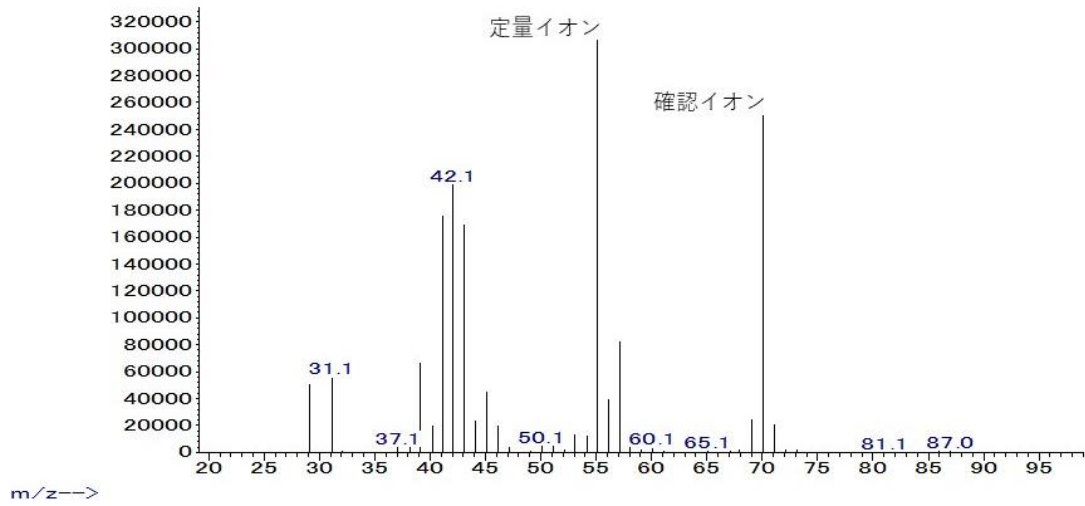


図 3-2-1 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (イソアミルアルコール)

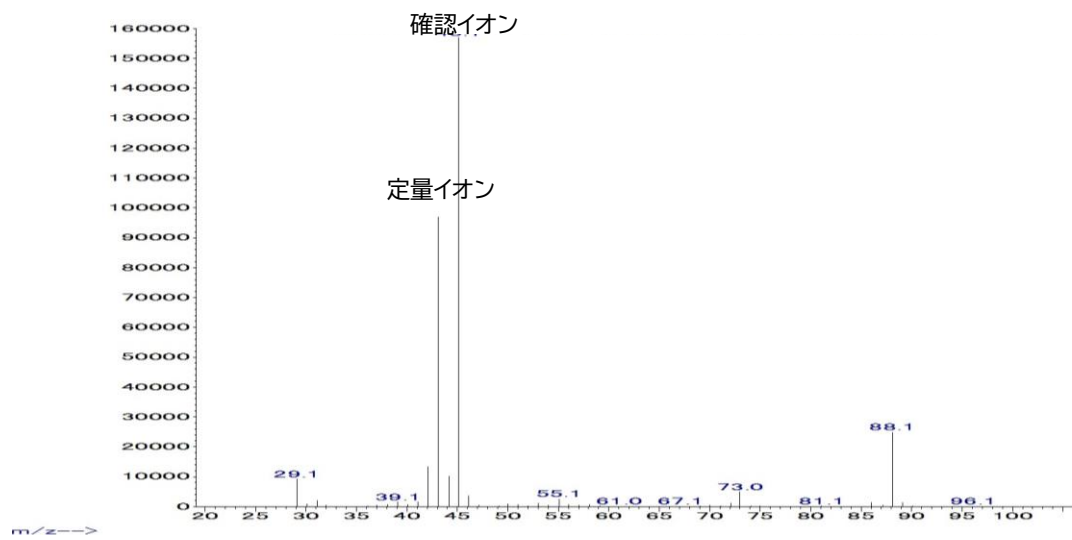


図 3-2-2 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (アセトイン)

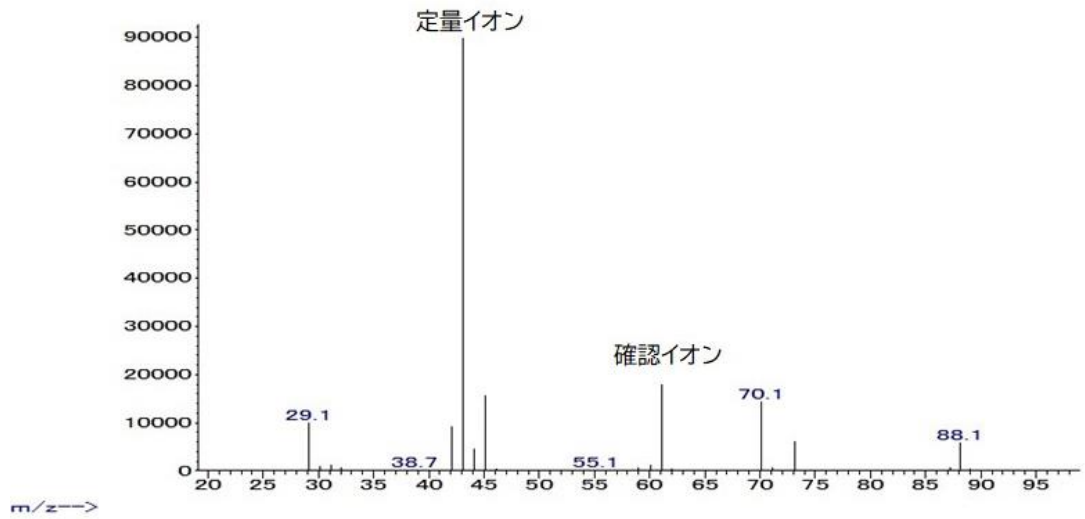


図 3-2-3 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (酢酸エチル)

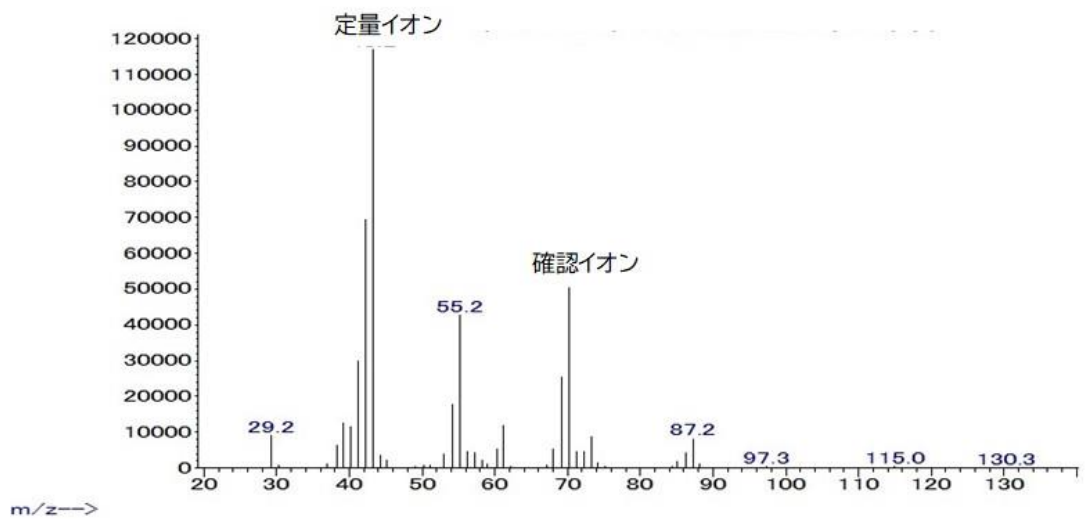


図 3-2-4 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (酢酸イソアミル)

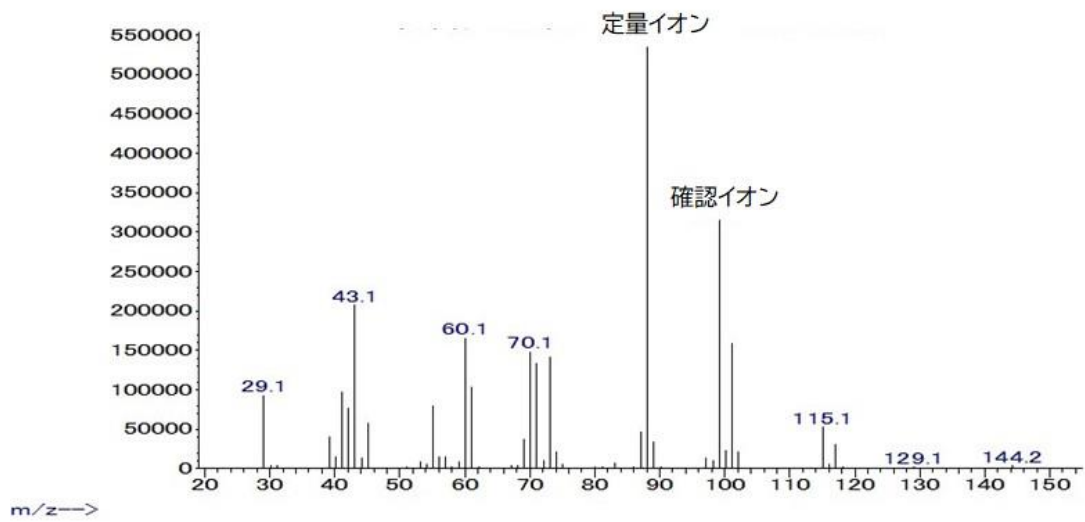


図 3-2-5 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (カプロン酸エチル)

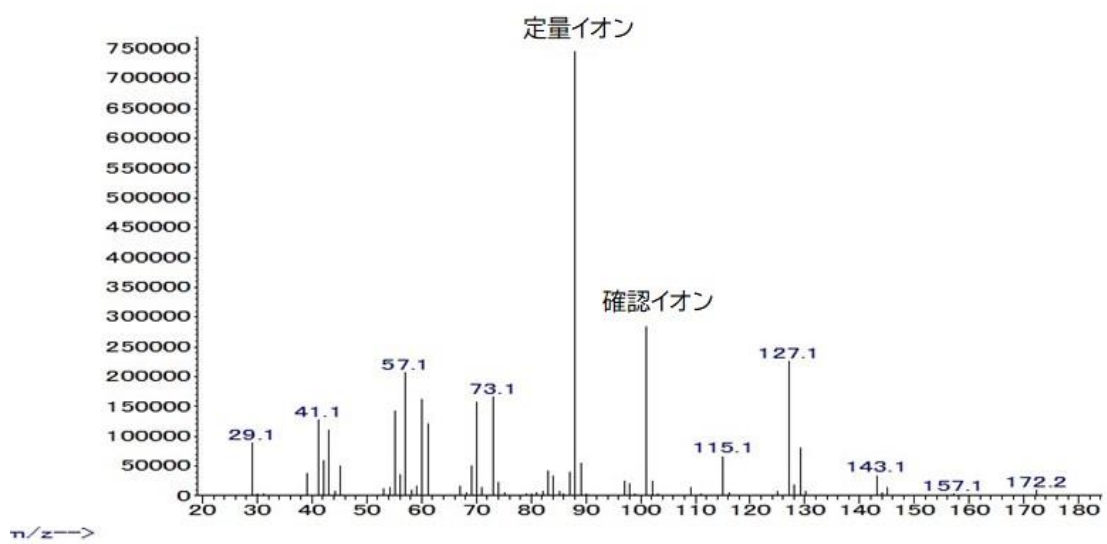


図 3-2-6 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (カプリル酸エチル)

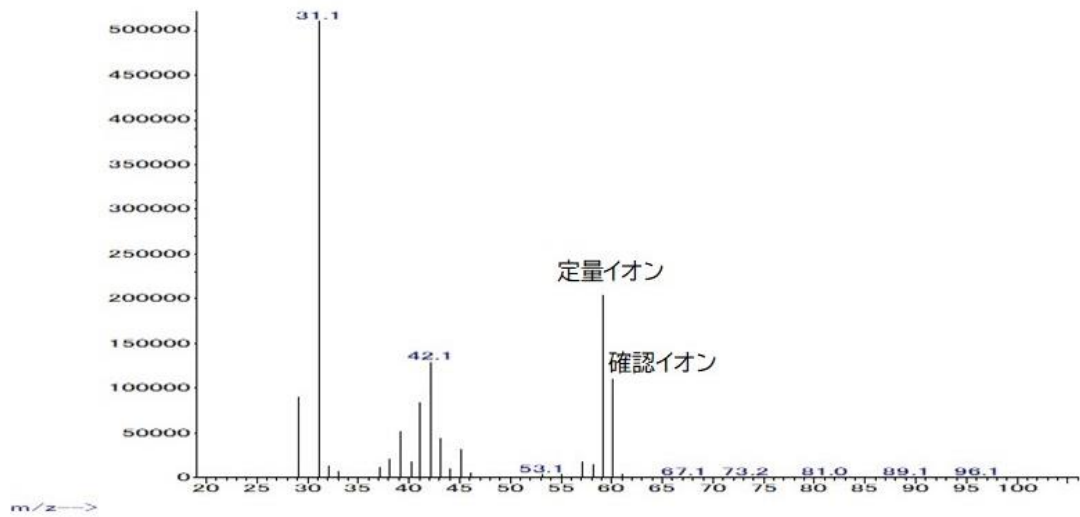


図 3-2-7 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (n-プロピルアルコール)

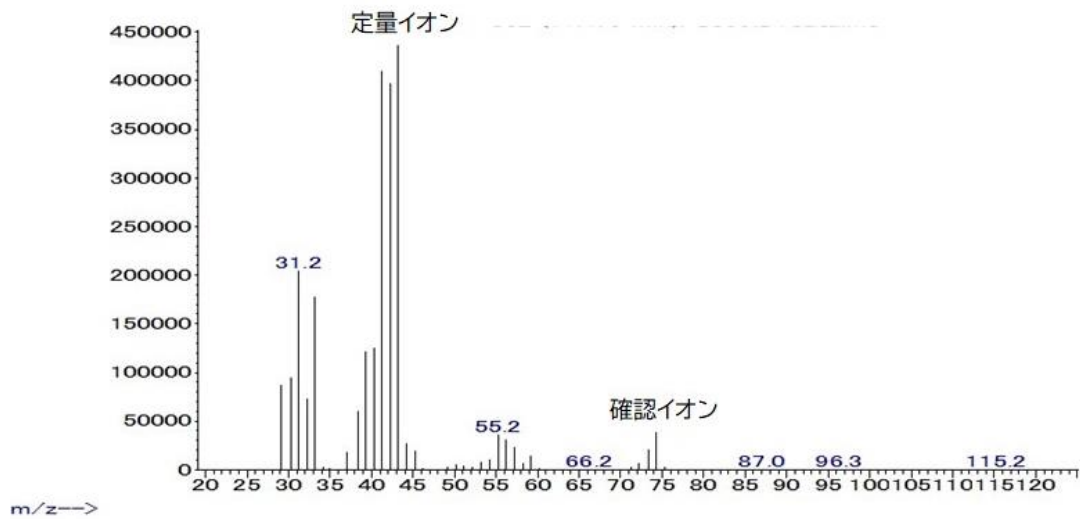


図 3-2-8 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (イソブチルアルコール)

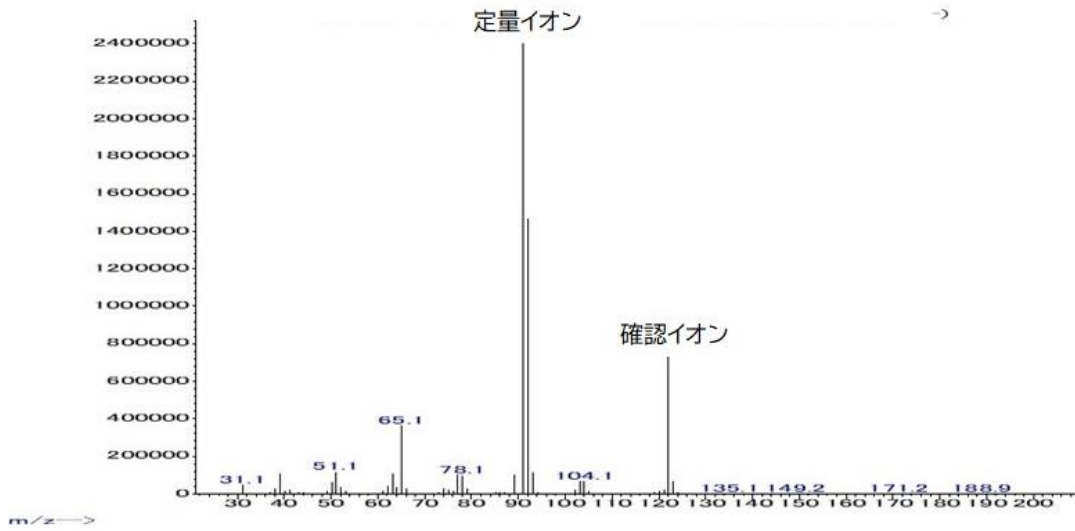


図 3-2-9 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (フェネチルアルコール)

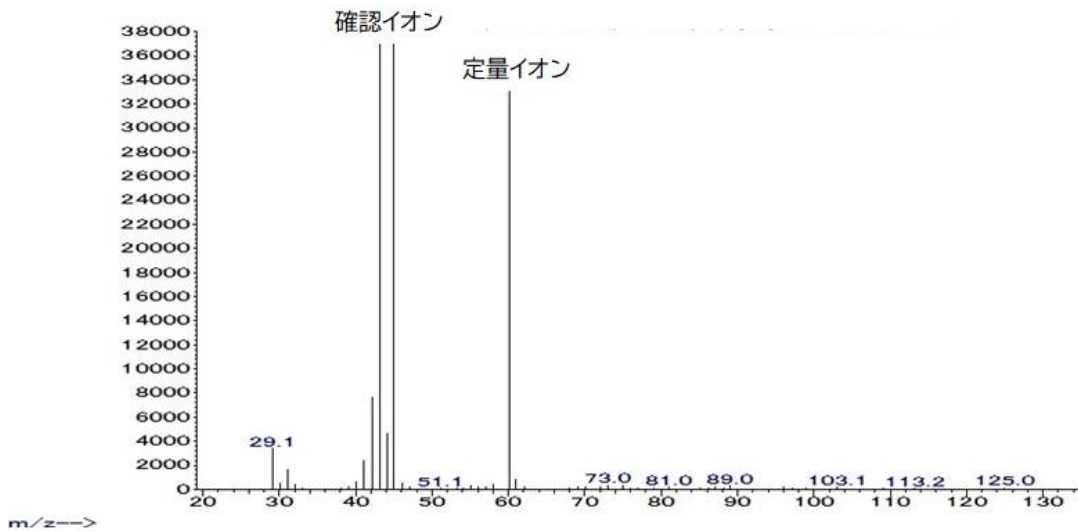


図 3-2-10 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (酢酸)

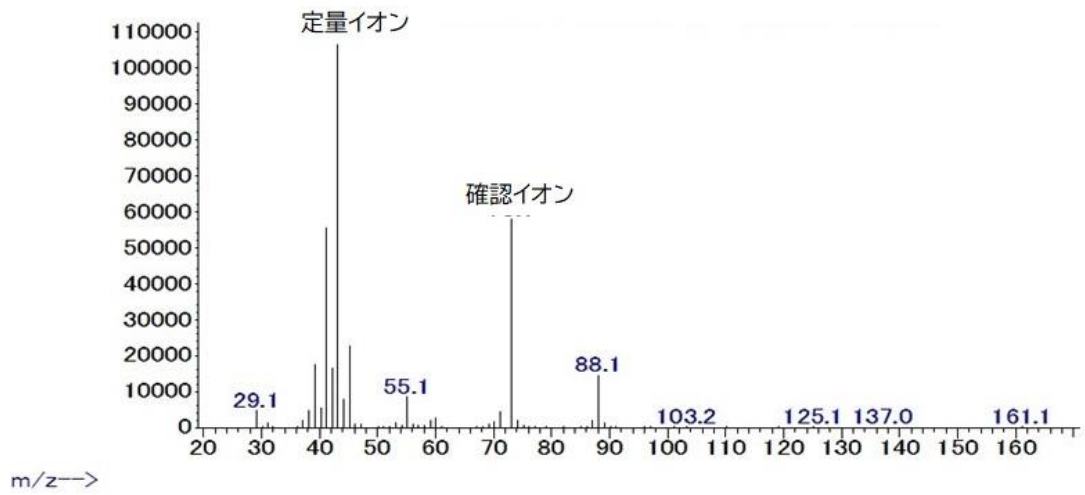


図 3-2-11 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル(イソ酪酸)

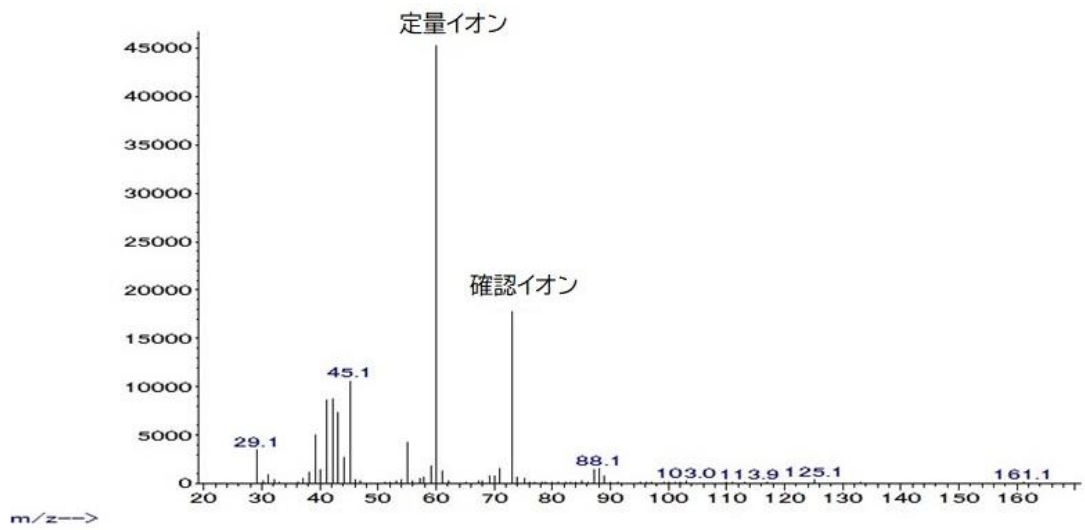


図 3-2-12 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (n-酪酸)

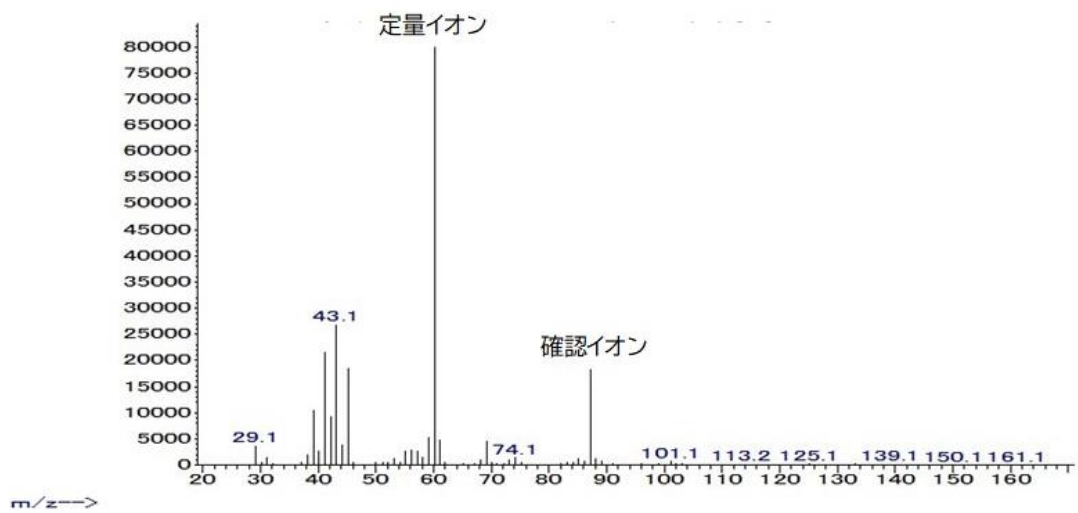


図 3-2-13 生地に含まれる香気成分のガスクロマトグラム イオンスペクトル (イソ吉草酸)

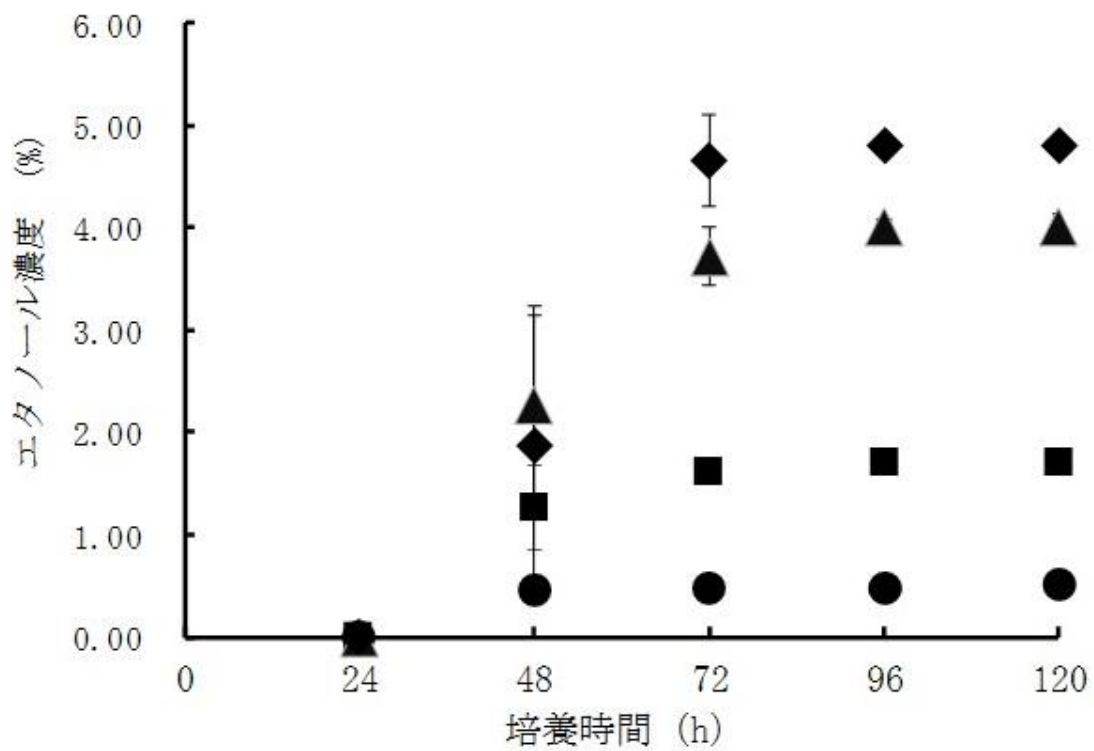


図 3-3 *L. fermentati* NM73 株の発酵による YD 液体培地でのエタノール生産量

●:スクロース 2%含有, ■:スクロース 4%含有, ▲スクロース 8%含有, ◆:スクロース 8%含有 (市販酵母 (イースト FG))

数値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す.

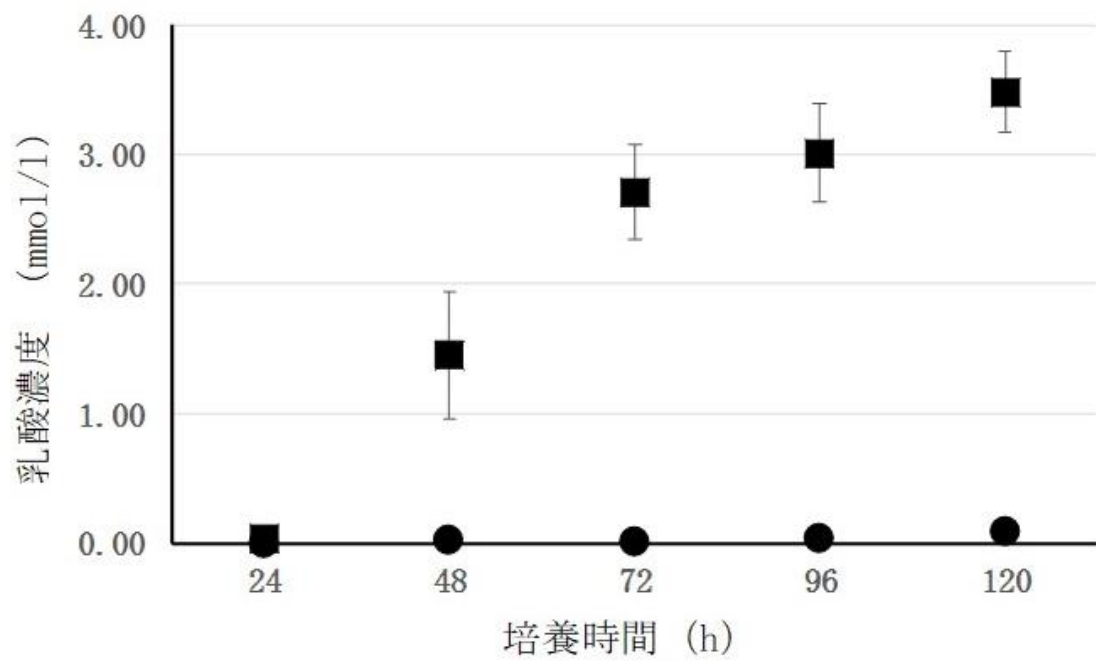


図 3-4 *L. fermentati* NM73 株の発酵による YP 培地（スクロース 8%）での乳酸生成量

● : 市販酵母 (イースト FG), ■ : *L. fermentati* NM73 株

数値は平均値±標準偏差 (n=3) を示す.

表

表 3-1 中華まん生地から発生した香気成分量

分析項目	RT(min)	定量イオン (m/z)	市販酵母 (イーストPG)	<i>L. fermentati</i> NM73
Isoamyl alcohol ($\mu\text{g/g}$)	13.41	55	12.9 \pm 0.02	13.4 \pm 2.1
Acetoin ($\mu\text{g/g}$)	15.04	43	34.1 \pm 2.1	2.17 \pm 0.58
Acetic acid ($\mu\text{g/g}$)	17.17	60	55.1 \pm 8.0	25.3 \pm 14.6
Isobutyric acid ($\mu\text{g/g}$)	18.68	43	3.01 \pm 0.36	2.03 \pm 0.78
<i>n</i> -Butyric acid ($\mu\text{g/g}$)	19.47	60	0.534 \pm 0.182	0.289 \pm 0.146
Isovaleric acid ($\mu\text{g/g}$)	19.97	60	0.654 \pm 0.132	0.268 \pm 0.027
Ethyl acetate ($\mu\text{g/g}$)	7.84	43	29.9 \pm 3.8	22.7 \pm 8.5
Isoamyl acetate ($\mu\text{g/g}$)	11.85	43	0.862 \pm 0.026	0.585 \pm 0.180
Ethyl Caproic Acid ($\mu\text{g/g}$)	13.74	88	0.0723 \pm 0.0081	0.0030 \pm 0.0010
Ethyl caprylate ($\mu\text{g/g}$)	16.77	88	0.157 \pm 0.020	0.0137 \pm 0.0075
<i>n</i> -Propyl alcohol ($\mu\text{g/g}$)	10.50	59	4.35 \pm 0.16	2.66 \pm 0.46
Isobutyl alcohol ($\mu\text{g/g}$)	11.45	43	22.8 \pm 0.5	14.8 \pm 4.6
Phenethyl alcohol ($\mu\text{g/g}$)	22.98	91	0.777 \pm 0.071	0.645 \pm 0.114

数値は平均値 \pm 標準偏差 (n=3) を示す.

表 3-2 中華まん生地に含まれる遊離アミノ酸量（報告値）

分析項目	定量限界値	市販酵母（イーストFG）	<i>L. fermentati</i> NM73
Arginine (mg/100g-wet)	—	6	9
Lysine (mg/100g-wet)	—	9	71
Histidine (mg/100g-wet)	—	3	9
Phenylalanine (mg/100g-wet)	—	1	2
Tyrosine (mg/100g-wet)	—	1	2
Leucine (mg/100g-wet)	1	定量限界未満	2
Isoleucine (mg/100g-wet)	1	定量限界未満	1
Methionine (mg/100g-wet)	1	定量限界未満	定量限界未満
Cystine (mg/100g-wet)	2	定量限界未満	分析不可
Valine (mg/100g-wet)	—	3	3
Alanine (mg/100g-wet)	—	14	12
Glycine (mg/100g-wet)	—	2	1
Proline (mg/100g-wet)	—	4	3
Glutamic acid (mg/100g-wet)	—	24	22
Serine (mg/100g-wet)	—	1	2
Threonine (mg/100g-wet)	—	2	2
Aspartic acid (mg/100g-wet)	—	11	10
Tryptophan (mg/100g-wet)	—	3	3

表 3-3 中華まん生地に含まれる有機酸量（報告値）

分析項目	定量限界値	市販酵母（イーストFG）	<i>L. fermentati</i> NM73
Citric acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満
Malic acid (g/100g-wet)	—	0.06	0.05
Tartaric acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満
Lactic acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	0.06
Acetic acid (g/100g-wet)	—	0.07	0.03
Fumaric acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満
Succinic acid (g/100g-wet)	—	0.03	0.04
Butyric acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満
Propionic acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満
Quinic acid (g/100g-wet)	0.01	定量限界未満	定量限界未満

第4章 総括

本研究では、中華まん生地の発酵に野生酵母を初めて利用するために、野生酵母を分離し、炭酸ガス発生能や生地の膨化能などの発酵特性で、スクリーニングし、中華まん生地に適用できる菌株の取得を試みた。

野生酵母が存在する可能性のある植物試料（樹皮、果実表面、蜜、樹液など）を採取し、MY 寒天培地を用いて微生物を分離し、分離コロニーを顕微鏡で観察して酵母細胞を選択した。

分離した酵母細胞は、各種糖類を基質として炭酸ガス発生能を試験し、スクロースに炭酸ガス発生能の高い菌株を選択した。

選抜した株の ITS 領域の増幅と塩基配列を決定することにより簡易的な同定を行なった。決定した配列の相同性を国際 DNA データベースで検索したところ、従来中華まん生地に用いられている *Saccharomycetaceae* 科の *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora uvarum* といった酵母を簡易同定することができた。

これらの菌株を用いて作った小麦粉生地の発酵力を、市販のパン酵母を対照に調べた。その結果、小麦粉生地の発酵試験では、市販酵母（イースト FG）と遜色ない発酵力を持つ *L. fermentati* を得ることができ、当初の目的の単離した野生酵母を利用して膨化した中華まん生地ができることを示すことができた。また、発酵させた小麦粉生地中には、*Saccharomyces cerevisiae* で発酵させた生地とは異なる特徴的な成分として、乳酸を生産すること、香气成分分析において、イソamilアルコールおよびアセトンが含まれ、オフフレーバーとして報告されている酢酸、イソ酪酸、*n*-酪酸、イソ吉草酸が少ないことが分かった。一方、アミノ酸分析においては、特徴としてリジンが検出された。

これらの結果から、自然界から採取した野生酵母を用い、中華まん生地を開発できる可能性を示すことができた。*Lachancea* 属は、ワインで広く見られるほか、自然界に広く存在している酵母で、*Saccharomycetaceae* 科に属する属の一つである。本研究で採取された *L. fermentati* は、クラフトビール発酵に適した野生酵母の探索において、選抜されている [33, 36]。また、液体培養での発酵性と小麦粉生地での発酵性の違いがあることも理解でき、液体培養のみの発酵性での評価では、不十分であることが分かった。

第1章では、中華まんの市場規模が増大しており、その市場の中で販売競争に打ち勝つ

ていくためには差別化が必要であり、中華まんにおいて、本格的な具材と併せ、特徴ある生地が求められていることが示唆されており、本論文においては、これまでに報告がない中華まん生地の発酵への野生酵母の利用において、生地が膨化できるかどうか検討することを目的とした。

さらに、野生酵母を採取・選抜し、選抜した酵母を評価し、選抜した酵母により発酵させて作った生地の特徴を調べ、中華まん生地への応用について考察した。

第2章では、果物、野菜、花、樹木等から、281株の酵母と思われる菌株を単離した。生地の発酵には炭酸ガスの発生が必要なことから、液体培地でのスクリーニングをしたところ、27株に炭酸ガスの発生が認められた。さらに ITS の配列に伴う同定から9株を選定し、さらに生地の発酵試験を行った。その結果、小麦粉生地を十分に、安定的に発酵させる酵母である *L. fermentati* に属する酵母から、生地の膨化能が強く、安定的に培養ができる菌株として、最終的に No. 190 株を選抜し、*L. fermentati* NM73 株と命名し、その ITS 配列を国際 DNA データベースに登録した。

第3章では、選抜した *L. fermentati* NM73 株の発酵および *L. fermentati* NM73 株を使用し発酵させて作った中華まん生地の特性を調査し、特徴的に香気成分や乳酸、リジンが含まれることを確認した。

今後の課題として、本研究では、野生酵母を中華まん生地の発酵に初めて利用するに当たり、まず、野生酵母が中華まん生地の発酵に利用できる可能性を検討したが、商品開発を見据えるには、どのような特色をもつ生地とするのか等の目標を予め明確にし、そのための菌の探索、スクリーニング方法等を十分に検討した上で研究を進めることが必要である。一方、本菌の利用については、本菌を用いて作った中華まん生地のテクスチャーの分析、詳細な成分分析が挙げられる。また、商品化につなげるための課題として、本菌を大量培養し一定量の安定した活性のある菌体を得ること、分離菌の発酵力の維持等の発酵品質の安定性、発酵した生地と中華まんの具材との相性、販売時における天然酵母の特性の訴求方法、試験方法の検討があると考えている。

引用文献

- 1) 藤本章人, 井藤隆之, 井村聡明; 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 (2012).
- 2) J. Steensels, K. J. Verstrepen; Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.*, **68**, 61-80 (2024)
- 3) C. Lahue, A. A. Madden, Anne, R. R. Dunn, C. S. Heil; History and domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in bread baking. *Front. Genet.*, **11**, 584781 (2020)
- 4) N. Komatsuzaki, R. Okumura, M. Sakurai, Y. Ueki, J. Shima; Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fruits and humus: their suitability for bread making. *Prog. Biol. Sci.*, **6**, 55-63 (2016).
- 5) 山田 密穂, 小泉 昌子, 赤石 記子, 峰木 眞知子; 酵母の違いがパンの品質に与える影響. 日本家政学会誌, **72**, 796-807 (2021).
- 6) S. Plessas, A. Fisher, K. Koureta, C. Psarianos, P. Nigam, A. A. Koutinas; Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. *Food Chem.*, **106**, 985-990 (2008).
- 7) Z. Lia, H. Lib, K. Songa, M. Cuia; Performance of non-Saccharomyces yeasts isolated from Jiaozi in dough fermentation and steamed bread making. *LWT - Food Sci. Technol. Res.* **111**, 46-54 (2019).
- 8) J. Shen, K. Shi, H. Dong, K. Yang, Z. Lu, F. Lu, P. Wang; Screening of sourdough starter strains and improvements in the quality of whole wheat steamed bread. *Molecules*, **27**, 3510 (2022).
- 9) B. Carbonetto, J. Ramsayer, T. Nidelet, J. Legrand, D. Sicard; Bakery yeasts; a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, **35**, 591-603 (2018).
- 10) 鎌倉 未貴, 眞山 眞理; スダチ花卉から分離した野生酵母 *Hanseniaspora meyeri* の製パンへの応用. 四国大学紀要, **34**, 37-46 (2012).
- 11) 山田 桂子, 佐伯 明比古, 平田 達哉, 渡辺 卓弘, 中野 良正; リンゴ果汁より分離した酵母の製パン適性. 山口県産業技術センター研究報告, **18**, 29-32 (2006).

- 12) 間瀬 雅子, 瀬見井 純, 幅 靖志, 小野 奈津子, 安田(吉野) 庄子, 高村 玲子, 中莖 秀夫; 花卉などから分離した *Saccharomyces cerevisiae* の製パン適性評価. あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センター研究報告, **2**, 72-75 (2014).
- 13) 杉原 千紗, 花岡 拓哉, 池田 達哉; 福山バラの酵母プロジェクト-製パンへの適用-. 福山大学生命工学部年報, **13**, 1-19 (2014).
- 14) 岩間 正典, 菅原 沙恵子, 武田 尚, 藤枝 弥生子; 天然酵母パンに含まれる酵母の多様性と数種酵母の性質. 研究紀要青葉 Seiyō, **12**, 71-81 (2021).
- 15) 河野 篤子, 甲斐 達男, 竜口 和恵; レーズンより単離した酵母の同定および製パン特性. 西南女学院大学紀要, **14**, 77-83 (2010).
- 16) 八木 葉奈子, 福山 紗英子, 黒川 正道, 大坪 泰輔; 青果物から分離した「天然酵母」の製パン試験. 化学と生物, **51**, 129-131 (2013).
- 17) E. Aslankoohi, B. Herrera-Malaver¹, M. N. Rezaei, J. Steensels, C. M. Courtin, K. J. Verstrepen; Non-conventional yeast strains increase the aroma complexity of bread. PLoS One, **11**, e0165126 (2016)
- 18) E. Borren, B. Tian; The important contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine; a review. Foods, **10**, 1-13 (2021).
- 19) R. Gaglio, A. Alfonzo, N. Francesca, O. Corona, R. D. Gerlando, P. Columba, G. Moschetti; Production of the Sicilian distillate “Spiritu re fascitrari” from honey by-products: an interesting source of yeast diversity. Int. J. Food Microbiol., **261**, 62-72 (2017).
- 20) 児玉 基一朗; ローカル酵母でオンリーワンのクラフトビールを. 産学官連携ジャーナル, **15**, 19-22 (2019).
- 21) 伊藤 彰敏, 小野 奈津子, 安達 真人, 内藤 俊, 沖塚 朔太, 三井 俊, 倉田 久美, 白井 瑠美, 績 順子; イチョウ花酵母を利用した地域ブランド純米酒の開発. あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 96-99 (2015).
- 22) 大橋 正孝, 都築 正男, 清水 浩美, 松澤 一幸, 藤野 千代, 鈴木 孝二, 岩口 伸一; ナラノヤエザクラの花からの有用な酵母の分離及びそれを使った清酒の開発. 奈良県工業技術センター研究報告, **14**, 35-38 (2009).
- 23) 井田 祐子, 佐藤 悦人, 丸田 航大, 田崎 裕二; 花から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の清酒醸造特性. 日本菌学会会報, **62**, 65-75 (2021).

- 24) 藤野 舜一, 川邊 久之, 小室 真保; 出羽三山植物体からのアルコール発酵能を有する野生酵母の単離. 日本醸造協会誌, **111**, 743-749 (2016).
- 25) 鈴木 成宗, 坂宮 章世, 金澤 春香, 栗田 修, 矢野 竹男, 荻田 修一; 樹液から単離した香気生産野生酵母のビール香気特性および実用性の評価. 日本食品工学会誌, **17**, 59 - 69 (2016).
- 26) M. Matraxia, A. Alfonzo, R. Prestianni, N. Francesca, R. Gaglio, A. Todaro, V. Alfeo, G. Perretti, P. Columba, L. Settanni, G. Moschetti; Non-conventional yeasts from fermented honey byproducts: focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. Food Microbiol., **99**: 103806 (2021)
- 27) C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, D. Schindel; Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **109**, 6241-6246 (2012)
- 28) 後藤 慶一; DNA塩基配列に基づくカビ・酵母の同定法—食品の汚染・変敗に関わる分類群への適用を中心に—. 日本食品微生物学会誌, **27**, 56-62 (2010)
- 29) 製パン試験法. パン用酵母試験法. p8-16, 日本イースト工業会 (1995).
- 30) D. Vu, M. Groenewald, S. Szöke, G. Cardinali, U. Eberhardt, B. Stielow, M. de Vries, G.J.M. Verkleij, P.W. Crous, T. Boekhout, V. Robert; DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. Stud. Mycol., **85**, 91-105 (2016)
- 31) 村山 宗明, 山口 英世; *Candida*属病原菌種の酸性プロテアーゼの分子生物学. 日本医真菌学会雑誌, **35**, 129-135 (1994).
- 32) M. Takaya, T. Ohwada, Y. Oda; Characterization of the yeast *Hanseniaspora vineae* isolated from the wine grape 'Yamasachi' and its use for bread making. Food Sci. Technol. Res., **25**, 835-842 (2019)
- 33) 矢野原 泰士, 日野 遥香, 松田 ともみ; 果実から分離した *Hanseniaspora uvarum* を使用したパンの香気特性. におい・かおり環境学会誌, **51**, 353-256 (2020)
- 34) K. Bellut, K. Krogerus, E. K. Arendt; *Lachancea fermentati* strains isolated from Kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. Front. Microbiol, **11**, 1-21 (2020).

- 35) T. J. Porter, B. Divol, M. E. Setati; Investigating the biochemical and fermentation attributes of *Lachancea* species and strains: deciphering the potential contribution to wine chemical composition. *Int. J. Food Microbiol.*, **290**, 273-287 (2019).
- 36) C. P. Kurtzman; Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. *FEMS Yeast Res.*, **4**, 233-245 (2003).
- 37) K. Osburn, J. Amaral, S. R. Metcalf, D.M. Nickens, C.M. Rogers, C. Sausen, R. Caputo, J. Miller, H. Li, J. M. Tennessen, M. L. Bochman. Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiol.* **70**: 76-84 (2018).
- 38) N. Yaacob, M. S. M. Alil, A. B. Salleh, N. A. A. Rahman; Effects of glucose, ethanol and acetic acid on regulation of ADH2 gene from *Lachancea fermentati*. *PeerJ*, **4**, 1-23 (2016).
- 39) T. J. Porter, B. Divol, M. E. Setati; *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res. Int.*, **119**, 378-389 (2019).
- 40) L. Ispiryan, M. Borowska, A. W. Sahin, E. Zannini, A. Coffey, E. K. Arendt; *Lachancea fermentati* FST5.1: an alternative to baker's yeast to produce low FODMAP whole wheat bread. *Food Funct.*, **12**, 11262-11277 (2021).
- 41) 古川那由太; 高発酵能と乳酸生成能を有する酵母 *Lachancea fermentati* KPC1 の発酵特性. *日本食品科学工学会誌*, **71**, 297-305 (2024).
- 42) 大西 博司, 岡田 寿, 鍛冶谷 孝, 森 治彦, 高木 誠一, 中村 考志, 佐藤 健司, 大槻 耕三, 澤田 小百合, 田代 操; 醸造微生物利用による製パン試験 (第3報) 乳酸菌添加パンの遊離アミノ酸組成と日持ち及びその摂食ラットの動脈硬化指数について. *日本醸造協会誌*, **97**, 219-227 (2002).
- 43) 加藤 寛之; 食品におけるオフフレーバーの分析事例. *におい・かおり環境学会誌*, **51**, 181-193 (2020).
- 44) 堤 浩子; 清酒酵母の香気生成の研究. *生物工学*, **89**, 717-719 (2011).

- 45) 日本食品標準成分表 2015 年版「アミノ酸成分表編」文部科学省 (2015).
- 46) 河田 美幸; リジン強化パン酵母の育種に向けた活性化型液胞リジントランスポーター発現変異株の創成. 東洋食品研究所研究報告書, **33**, 101-102 (2020).

引用 URL

- i) <https://www.glico.com/nutrition/tabemono/food/16/index.html> グリコ栄養食品
たべもの事典 中華まん (2024. 7. 21)
- ii) <https://news.nissyoku.co.jp/special/590737> 日本食糧新聞 2019. 10. 02・中華まん
特集 (2024. 7. 21)
- iii) <https://news.nissyoku.co.jp/special/768101> 日本食糧新聞 2021. 10. 13・中華まん
特集 (2024. 3. 21)
- iv) <https://www.reishokukyo.or.jp/statistic/quantity-dom-item/> 日本冷凍食品協会
品目別国内生産量・金額 (2024. 7. 21)
- v) <https://news.nissyoku.co.jp/special/965039> 日本食糧新聞 2023. 10. 16・中華まん
特集 (2024. 7. 21)
- vi) <https://www.panstory.jp/pdf/tennenkobohyoji.pdf> 社団法人 日本パン技術研究所
天然酵母表示問題に関する見解 PD (2024. 7. 21)

要 約

本研究では、特徴的な中華まん生地の開発に利用できる酵母を発見するために、植物から野生酵母を分離し、その炭酸ガス産生能などの発酵特性でスクリーニングした。

まず、野生酵母が存在する可能性のある試料（樹皮、果実表面、蜜、樹液など）を採取し、MY寒天培地を用いて微生物を分離し、分離コロニーを顕微鏡で観察して酵母細胞を選択した。

分離した酵母細胞は、炭酸ガス産生能を試験し、基質としてスクロースに炭酸ガス産生能の高い菌株を選択した。

選別した酵母の ITS 領域の塩基配列を決定し、得られた配列の相同性を検索して、*Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora uvarum*, といった酵母を同定した。

これらの菌株を用いて作った生地の膨化力を、市販のパン酵母を対照に比較し、遜色ない発酵力を示した *L. fermentati* に属する酵母を本研究における最終選抜酵母とした。本菌を *L. fermentati* NM73 と命名し、発酵させた小麦粉生地の成分を調べた。本菌により発酵させた小麦粉生地には、特徴的な成分として、乳酸や遊離のリジンを多く含むこと、香気成分としてイソアミルアルコール（果物の様な甘い香りを付与）を含むこと、オフフレーバー（酸臭や発酵臭に由来する揮発性脂肪酸（酢酸、イソ酪酸、*n*-酪酸、イソ吉草酸）の産生量が少ないことなどがわかり、特徴ある中華まんの生地の開発の可能性を示した。

学会発表および論文への発表実績

本学論文に係る成果は以下の学会および論文にて報告した。

国際学会

地域イノベーション国際ワークショップ 2021 令和3(2021)年10月21日, 三重大学
Masahiro Nakamura, Daichi Ito, Shuichi Karita; Application of wild yeasts for
Chinese bun dough making, Proceedings of the 13th International Workshop on Re-
gional Innovation Studies (IWRIS2021), p43-46 (2021).

論文

中村昌弘, 伊藤太一, 荻田修一; 単離・同定された天然酵母の中華まん用酵母としての特
性について. 日本食品工学会誌, **24**, 69-75 (2023) .

訂正

日本食品工学会誌 (Vol. 24, No. 3, p. 69-75, 2023) に掲載後, 以下の様に p. 71 の左側
の 38 行目の訂正を提示し, 日本食品工学会誌 (Vol. 24, No. 4, p. 129, 2023) に以下の通り
掲載した.

(誤) パン酵母として使用されている

(正) 自然界から単離した

謝 辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり，指導教官として終始多大なご指導を賜った三重大学大学院生物資源学研究科荻田修一教授に深く感謝の意を表します．

作成にあたり懇切なるご指導をいただきました三重大学大学院地域イノベーション学研究科矢野竹男教授，西村訓弘教授，諏訪部圭太教授，狩野幹人准教授，八神寿徳准教授，生物資源学研究科末原憲一郎教授に深く感謝の意を表します．

本研究を遂行するにあたり，三重大学研究基盤推進機構先端科学研究支援センター電子顕微鏡部門小川覚技師専門員に深く感謝の意を表します．

本研究を遂行するにあたり，ご協力頂きました三重県工業研究所長谷川圭司主幹研究員に深く感謝の意を表します．

私が勤務する井村屋グループ株式会社 浅田剛夫取締役会議長，中島伸子会長，大西安樹社長，昨年まで勤務していた井村屋株式会社 岩本康社長，益川博副社長におかれましては，私が三重大学で研究活動を行うことを許可いただき，学ぶ機会を与えてくださり深く感謝の意を表します．

最後に，伊藤太一さんをはじめとする三重大学食品発酵学研究室の皆様には，本研究の遂行にあたり多大なご助言，ご協力頂きました．深く感謝の意を表します．

英文要約

In this study, wild yeasts were isolated from plants and screened for their fermentation characteristics, such as carbon dioxide production capacity, to identify yeasts suitable for developing distinctive Chinese bun dough.

First, samples (bark, fruit surfaces, nectar, sap, etc.) potentially containing wild yeast were collected. Microorganisms were isolated using MY agar medium, and yeast cells were selected by observing the isolated colonies and cells under a microscope.

The isolated yeast cells were then tested for their ability to produce carbon dioxide gas. Strains with high carbon dioxide production on sucrose as a substrate were selected.

The ITS region of the selected yeasts was sequenced, and the yeasts identified through sequence homology included *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora vineae*, and *Hanseniaspora uvarum*.

The dough's swelling power made with these strains was compared with that of dough made with commercial baker's yeast as a control. The yeast belonging to *L. fermentati*, which demonstrated similar fermentation power, was selected as the final yeast in this study. This yeast was named *Lachancea fermentati* NM73, and the components of the fermented flour dough were analyzed. The dough fermented by this strain contained lactic acid and free lysine as characteristic components, isoamyl alcohol (which imparts a fruit-like sweet aroma) as an aroma component, and fewer off-flavors (volatile fatty acids such as acetic acid, isobutyric acid, n-butyric acid, and isovaleric acid) than the commercial yeast. The results indicated the potential for developing doughs with distinct characteristics.