

# 天然酵母パン種に含まれる酵母の多様性と、 数種酵母の性質

## DIVERSITY OF YEASTS IN NATURAL YEAST BREAD SEEDS AND PROPERTIES OF SEVERAL YEASTS

岩間 正典<sup>[1]</sup> ・ 菅原沙恵子<sup>[1, 2]</sup> ・ 武田 尚<sup>[3]</sup> ・ 藤枝弥生子<sup>[1]</sup>

IWAMA Masanori, SUGAWARA Saeko, TAKEDA Hisashi, FUJIEDA Mioko

キーワード：酵母、サッカロミセス・セレビシエ、発酵

Key words : yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

### 要 旨

いわゆる「天然酵母パン」に含まれる酵母及び乳酸菌の実態について調べた。回答が得られた天然酵母パン店の多くは実際に各々が採取した酵母を使用していた。菌種を調べたところ、酵母は *Saccharomyces cerevisiae* が主力だったが、*Candida* 属などアルコール耐性の強くない菌株も含まれていた。乳酸菌はほぼ常在乳酸菌で、サワー種には乳酸菌が多く含まれていたが、そのほかのパン種に含まれる乳酸菌量の差異は大きかった。*S. cerevisiae* について分子系統樹を作成したところ、清酒酵母協会7号とも比較的近縁で、フランス産パン酵母とは違いが大きく、国内で採取される酵母は比較的近縁なものが多いことが推測された。発育良好な *S. cerevisiae* についてアルコール発酵試験を行ったところ、協会7号と同等かそれ以上の発酵速度の株が数株得られた。今後醸造試験及びエタノール産生試験を進める。

### Abstracts

The actual conditions of yeast and lactic acid bacteria contained in so-called "natural yeast bread" were investigated. Many of the bakeries that responded to the survey used yeast that they had actually collected themselves. The main strain of yeast was *Saccharomyces cerevisiae*, but there were also strains of *Candida* and other fungus that were not so highly resistant to alcohol. A molecular phylogenetic tree of *S. cerevisiae* showed that it was relatively closely related to Sake Yeast Kyokai No. 7 but differed considerably from French baker's yeast. It was inferred

[1] 仙台青葉学院短期大学栄養学科  
受理日：2021年3月15日

[2] 現所属：十文字学園女子大学人間生活学部

[3] 星薬科大学薬学部

that many of the yeasts collected in Japan are relatively closely related. We conducted alcoholic fermentation tests on well-grown *S. cerevisiae* and obtained several strains with a fermentation rate equal to or higher than that of Kyokai No. 7. We will proceed with brewing and ethanol production tests in the future.

## 【はじめに】

パンは酵母を使って生地を発酵させて焼成して作られている。酵母は単細胞の真菌の総称で、その中でアルコール発酵する菌は清酒、ワイン、ビールなどの醸造には不可欠である。パンの発酵はアルコール発酵の過程で発生する二酸化炭素をパン生地を膨らませるために利用している。これらの発酵にはもともとはそれぞれの場所に自然に生育していた酵母が使われていたが、現在ではそれぞれの産業で安定した酵母が使えるよう、酵母の管理が進められている。清酒の発酵であれば、日本醸造協会が協会系酵母を管理・頒布している。パンの発酵でも、パン発酵に適した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をパン酵母 (イースト) として使用している。また一部では *Candida* 属の一種も使用されている。一方、近年ではいわゆる「天然酵母パン」が売られていることも多くなった。これらは野菜や果物等から採取した酵母を使用しているもので、乳酸菌も同時に採取されることが多く、それぞれのパンに独特な風合いを出すこともあり、また「天然」という言葉に魅力を感じられることから広がりを見せている。しかし、使っている菌種についてはパン製造に必要なアルコール発酵をするという以外には詳細は不明なものが多い。一方で、「天然酵母」を販売している専門業者も複数存在し、実際に購入して自家製パンを製造することも行われている。

「天然酵母」という表現は工場で製造されるパンの発酵に使う「イースト」と対比するもので、イーストは天然ではない人工的なものという印象を与える用語である。日本イースト工業会では次のような見解を発表している[1]。[パン酵母は、カビ、酵母、細菌などの種々の微生物が生息している自然界から、最も製パンに適したものを選別して培養したものです。酵母は英語でイースト (Yeast) です。イースト＝酵母です。生き物である酵母に「天然」や「人工」という区別はありません。天然酵母使用と印刷物に記載されているパンが見受けられますが、イーストに天然と人工の区別はありませんので、ことさら天然酵母を強調する言葉を使うことは不適切であると考えております。](抜粋)。このように述べているが、依然としてイーストと酵母は別物とか、天然酵母のほうがより安全などと考える人も多い。

酵母は多くの生物上に存在し、比較的容易に採取できることや、天然食ブームもあって個人で採取することも多い。果物や穀類、花等から採取した酵母について種の同定報告や、発酵への利用などが多数報告されている[2-8]。その結果からは、*S. cerevisiae* が多いものの、他の *Saccharomyces* 属や、*Candida* 属、*Pichia* 属、*Hanseniaspora* 属、*Kluyveromyces* 属など多様な菌種が見出されている。さらに自然界や発酵種などから多様な酵母の分離報告がなされているが、多く利用されている酵母の解析報告の例を挙げると、保存清酒酵母はいずれも *S. cerevisiae* であり[9]、ワインの場合でもブドウ果皮には *S. cerevisiae* は比較的少なく、*Hanseniaspora* 属や *Candida* 属等が多いにもかかわらず、発酵菌種は *S. cerevisiae* と報告されている[10]。

パンに使用されている酵母についても多くは *S. cerevisiae* であるが、*S. exiguous* を使うパン種[11]や、特にサワー種では *Candida* 属も使われている[12, 13]。なお、*Candida humilis* は近年 *Kazachstania humilis* に改名になっている[14]が、本論文では他の *Candida* 属と同じく *Candida* として扱う。

日本国内で販売されている天然酵母パン種に使用されている菌種を広く調査した報告例は見当たらない。そこで、我々は仙台市内並びに日本国内で「天然酵母パン」を販売しているパン業者に酵母の入手方法についてアンケートによる実態調査を行い、実際に酵母を採取・利用している業者に依頼して、パン種の提供を受けた。提供されたパン種に含まれている酵母を同定するとともに、特徴的な酵母についてその性質を調べ、アルコール発酵に適した酵母の選別を行った。

## 【調査・実験方法】

### 1. アンケート調査方法

平成28年にインターネット上で「天然酵母パン」を標榜しているパン業者を検索し、仙台市内30店、仙台市以外30店にアンケート調査を実施した。調査内容は、①使用酵母は自家で採取した酵母か、譲渡または購入したものか、②-a 自家で採取した酵母の場合、採取材料・時期、②-b 譲渡または購入の場合、その入手先、③自家で採取した酵母の場合、パン種の提供は可能かどうかの4項目である。

パン種の提供が「可能」な業者には、改めてパン種の提供を依頼した。

### 2. 使用培地

酵母培養用 YPD 培地：酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース2%、寒天1.5%（寒天培地の場合）

YPD-A 培地：YPD 培地にアンピシリン100  $\mu\text{g/ml}$  を加えた。

乳酸菌培養用 BCP 加プレート寒天培地：メルクミリポア社から購入し、クロトリマゾール4  $\mu\text{g/ml}$  またはシクロヘキシミド10  $\mu\text{g/ml}$  を加えて使用した。

酵母のアルコール発酵試験には YPD ブイヨン培地のグルコース濃度を20%に変更して使用した。

### 3. 比較対象酵母

NBRC（独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター）より清酒酵母の NBRC2347（日本醸造協会 協会7号酵母）、パン酵母の NBRC2375（Red Star パン用酵母）および NBRC110417（ニッテンイーストパン用酵母）を入手した。そのほかに市販パン酵母として丹沢酵母パン種（ホシノ天然酵母パン種）、白神こだま酵母ドライ（秋田十條化成）およびサフィンスタントドライイースト赤ラベル（ルサッフル社）を購入した。

### 4. パン種中に含まれる菌の分離培養

提供を受けたパン種について、PBS で段階希釈して、酵母は YPD-A 培地を用い30°C培養し、生育したコロニー数から元の菌数を算出した。同様に乳酸菌は BCP 加プレート寒天培地を使用し、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用いて30°Cで嫌気培養して算出した。

### 5. 乳酸菌の菌種同定

乳酸菌の菌種同定には真正細菌の16S rDNA の共通プライマーである 27f（AGAGTTTGATCCTGGC TCAG）および 1525r（AAAGGAGGTGATCCAGCC）を使用した[15]。プライマーは日本遺伝子研究所に合成依頼をした。なお、その他のプライマーも同様にして入手した。PCR は得たコロニーについて MightyAmp DNA polymerase Ver.3（タカラバイオ）を用いたダイレクト PCR で行った。PCR 条件は変性98°C、アニーリング55°C15秒、伸長68°C90秒で行った。PCR 産物は電気泳動後 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（タカラバイオ）を用いてゲル抽出した。抽出 DNA はマクロジェン・ジャパン(株)に

シーケンス解析を依頼した。

得られた解析結果をもとに NCBI BRAST でホモロジー検索を行い、最も配列類似度が高いものを同定菌種とした。いずれも配列類似度は99%~100%であった。

## 6. 酵母の菌種同定

酵母の大まかな菌種同定には、真菌18S rDNA・28S rDNAのスペーサー領域について、Whiteらの方法[16]に基づき、共通プライマーである ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) および ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) を使用した。PCRのアニーリング温度58℃以外は乳酸菌と同様に行った。菌種の同定も同様に行った。

## 7. *Saccharomyces cerevisiae* の分子系統樹

*S. cerevisiae* と同定された菌株について、さらに酵母インベルターゼの SUC2遺伝子[17]中の SCS-1 (GGAGGTTTCCCAATGAACAAAG) および SCS-6 (GGCAGCCGTCATAATCCATTTTTG) をプライマーとして、伸長反応時間のみを120秒に変更して PCR し、得られた PCR 産物は前述のキットで精製後、Mighty TA クローニングキット (タカラバイオ) で pMD20-T ベクターに挿入し、大腸菌 JM109 コンピテントセルにクローニングした。クローニングしたベクターの挿入配列はベクター中の SP6 及び M13M4 をプライマーとして双方向からシーケンス解析し、約1350塩基の配列を得た。

得られた配列は、多重整列プログラム CLUSTAL W でアラインメント後、分子系統解析のソフト MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) を用いて最尤法で分子系統樹を作成した。

## 8. エタノール産生能試験

20%グルコースを含む YPD 培地に前培養して600nmの吸光度(濁度)0.200に調整した菌株1/20量を添加し、30℃で静置培養した。一定時間後にサンプリングし、グルコース CII テストワコー (富士フィルム和光純薬工業) で残存グルコース量を定量し、48時間培養後のサンプル中のエタノール量を F キット エタノール (JK インターナショナル) で定量した。

### 【結果】

#### 1. 天然酵母パン種のアンケート結果と実験に使用したパン種

仙台市内でインターネット上において天然酵母パンを標榜しているパン店30店と、仙台市以外から同数の30店の天然酵母パン店に対しアンケート調査を実施した。仙台市内の2店はアンケートが未着だったため、合計58店の結果を表1に示す。

表1 天然酵母パンアンケート結果

所在地	調査数	回答数	酵母入手方法の内訳		
			自家採取酵母	市販酵母	不詳
仙台市内	28	9	5	3	1
仙台市以外	30	7	4	3	0

回答数が少なかったため、明確ではないが、回答を得た16店のうち半数以上の9店が実際に自家で採取した酵母を使用していた。自家で採取という回答のうち、採取材料(複数回答)としてレーズンを挙げた店が5店、全粒粉2店、小麦2店、ライ麦2店、小麦+ライ麦2店、米麴(酒種)2店、その他果物1店

2種（シークアーサー、柚柑）、ホップ1店であった。採取後の保存・植え継ぎ状況などの詳細は不明だが、実際に採取して植え継いでいるものと思われる。

9店のうち7店からはパン種の提供可能との回答が得られたが、5店から実際に提供を受けることができた。5店のうち1店からは系列店を含めて複数店舗からそれぞれ複数のパン種の提供があった。店でのパン種名と採取材料名とはおおむね矛盾がなかったが、系列店舗間で同じパン種を使用しているかどうか、また、パン種間で元となる採取材料が実際に異なっているかどうかは明確ではなかったため、網羅的に解析をすることにした。

得られたパン種は、店舗名の頭文字（同一系列の場合は2文字）＋パン種名称略号で表記することにした。以後の実験に使用したパン種は表2の通りである。

表2 使用したパン種の一覧(全32種)

パン種名	表 記 名								
	SS	SH	SK	SO	SF	C	G	L	P
レーズン	SSRA	SHRA	SKRA	SORA	SFRA	CRA	GRA	LRA	—
ルヴァン	SSLE	SHLE	SKLE	—	SFLE	—	GLE	—	—
ルヴァンリキッド	SSLI	SHLI	SKLI	SOLI	SFLI	—	GLI	—	—
サワー	SSSO	SHSO	SKSO	—	SFSO	—	GSO	—	—
ホップ	—	—	—	SOHO	—	—	GHO	—	—
酒種	—	—	—	—	—	—	GSA	LSA	—
老麺	—	—	—	—	—	—	GRO	—	—
全粒粉	—	—	—	—	—	—	—	LZE	—
小麦	—	—	—	—	—	—	—	—	PWH
ライ麦	—	—	—	—	—	—	—	—	PRY

## 2. パン種に含まれている酵母及び乳酸菌の菌数

入手したパン種をPBSに懸濁し、平板培地に混釈培養した。その結果得られたパン種1g中の菌数を表3に示す。

表3 パン種中の酵母及び乳酸菌数

パン種	酵母		乳酸菌		パン種	酵母		乳酸菌	
	(×10 <sup>6</sup> /g)		(×10 <sup>6</sup> /g)			(×10 <sup>6</sup> /g)		(×10 <sup>6</sup> /g)	
SSRA	40	—	—	—	SFLE	27	—	—	—
SSLE	18	—	—	—	SFLI	22	0.1	—	—
SSLI	58	—	—	—	SFSO	11	160	—	—
SSSO	39	25	—	—	CRA	60	67	—	—
SHRA	58	—	—	—	GRA	61	0.5	—	—
SHLE	39	—	—	—	GLE	14	31	—	—
SHLI	56	—	—	—	GLI	15	120	—	—
SHSO	25	160	—	—	GSO	1.7	48	—	—
SKRA	40	—	—	—	GHO	80	4.4	—	—
SKLE	23	—	—	—	GSA	149	72	—	—
SKLI	28	—	—	—	GRO	41	1.6	—	—
SKSO	12	130	—	—	LRA	5.7	1.6	—	—
SORA	44	4	—	—	LSA	12	—	—	—
SOLI	28	0.1	—	—	LZE	20	—	—	—
SOHO	60	10	—	—	PWH	1.1	600	—	—
SFRA	32	5.8	—	—	PRY	57	220	—	—

— : 0.1×10<sup>6</sup>/g 未満

酵母菌数は最少 $1.1 \times 10^6$  個/g、最大 $1.49 \times 10^8$  個/g と100倍以上の差が認められた。これはパン種の状態をコントロールしていないことが影響していて、実際のパン発酵に使用する状態とは異なるため、パン種間での菌数比較とはならなかった。一方、乳酸菌はサワー種にはおおむね酵母より多い菌数の乳酸菌が認められ、多くは10倍以上であった。また、P店の種はサワー種ではないが、サワー種同様に乳酸菌が多い特徴があった。一方で、S店系列のパン種ではサワー種以外では乳酸菌はほとんど含まれていなかった。そのほかのパン種の多くには乳酸菌が含まれていたが、酵母と乳酸菌の比率はバラバラで、天然発酵パンにおける乳酸菌による味への影響が多様であることが推測された。

なお、乳酸菌分離培養に使用したBCP加プレート寒天培地に生育した細菌のコロニーはいずれも黄変したことから、乳酸菌以外の細菌はほぼ含まれていないと思われる。しかし一方で、抗真菌薬添加であるにもかかわらず、培地を黄変せず、顕微鏡観察での形状から酵母と判定される菌株がSOLI、SFLE、SFLI、SFSOから見いだされた。これらは、乳酸菌と区別して菌数を計数したところ、YPD-A培地で計数した酵母の菌数とほぼ一致し、これら4パン種の酵母はいずれも抗真菌薬耐性と考えられた。

分離した菌は顕微鏡観察を行い、特徴的な菌を選別し、各パン種から数株ずつを $-80^{\circ}\text{C}$ グリセロールストックし、以後の実験に用いた。

### 3. 乳酸菌の菌種同定

一部同定できなかった菌株があるが、得られた同定結果を表4に示す。

表4 同定した乳酸菌の菌種

パン種	菌種
SSSO	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
SHSO	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
SKSO	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
SORA	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SOLI	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
SOHO	<i>Lactobacillus brevis</i> 及び <i>Lactobacillus paracasei</i> (or <i>casei</i> )
SFRA	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SFLI	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
SFSO	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i>
CRA	<i>Lactobacillus plantarum</i> 及び <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
GRA	<i>Lactobacillus plantarum</i>
GLE	—
GLI	<i>Lactobacillus sanfranciscens</i> 及び <i>Lactobacillus plantarum</i>
GSO	—
GHO	—
GSA	—
GRO	—
LRA	—
PWH	<i>Lactobacillus sakei</i> 及び <i>Leuconostoc citreum</i>
PRY	<i>Lactobacillus sakei</i>

—：同定できず

*Lactobacillus sanfranciscens* が一番多く、次いで *L. plantarum*、その他の *Lactobacillus* 属、さらには *Leuconostoc* 属も見いだされた。得られた乳酸菌はパン発酵種によく見いだされる菌種で、特にサワー

種の主力乳酸菌として知られている[12, 13]。また、いずれの乳酸菌も漬物や日本酒などの発酵食品にもよくみられる常在乳酸菌であった。

#### 4. 酵母の菌種同定

同定できた菌種の多くは *Saccharomyces cerevisiae* であった。その中で、SSSO、SSLI、SSLE、SKLI、SKLE、SOLI、SFLI には *Candida humilis* が含まれていて、そのうち SOLI、SFLI の菌株は抗真菌薬耐性株であった。*C. humilis* はサワー種としてパン発酵に広く使われている酵母である。*Candida* 属には抗真菌薬に耐性株が広まっていることが知られている[18]が、天然から採取した株にも抗真菌薬耐性があるという結果になった。また、SKRA と SKLE には *Hanseniaspora uvarum* も存在したが、この酵母はワイン産地のブドウの果皮に常在する酵母として知られている[19]。一方、PWH および PRY に含まれる菌株はほぼすべて *Kazachstania servazzii* であった。この菌はキムチなどの漬物から分離される酵母として知られている[20]。

#### 5. *Saccharomyces cerevisiae* の分子系統樹

酵母のうち多くは *S. cerevisiae* であったため、さらに詳細な比較のために、本菌種特有のインベルターゼの SUC2 遺伝子のうち1350塩基対をクローニングして、配列を決定した。全長配列が得られた20株の配列を CLUSTAL W を用いて配列アラインメントし、MEGA-X で分子系統樹を作成した。比較対象として清酒酵母協会7号 (No. 7) と市販のパン酵母2種、ルサッフル社のサフドライイースト赤 (SAF) とホシノ天然酵母社の丹沢酵母パン種 (TA) を用いた。結果を図1に示す。

SAF 以外はよく似た配列で、系統樹でも近い関係になった。清酒酵母である No. 7 酵母と天然酵母の多くが近縁であったことは、日本国内で得られる酵母の多くは互いに近縁であることを示唆している。また、S 店並びに系列店の多くの酵母と L 店の酵母は実質的に同じ菌株といえるほど近縁であった。なお、略号に続く数字は保存菌株の番号を示している。

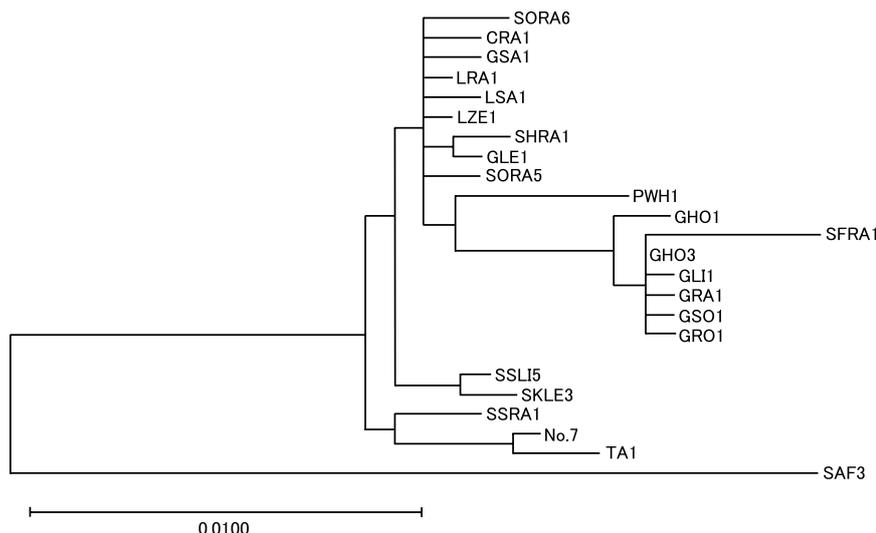


図1 得られた *Saccharomyces cerevisiae* の系統樹

#### 6. 酵母の生育温度の比較

得られた酵母を実際のアルコール生産に用いようとするとき、飲用アルコールであれば、その味が第一となるが、工業的な生産という面では、エタノール産生が速いこと、高温でも安定して産生することが望ましい。そのため、手始めに37℃以上での生育の状況を確認した。37℃では *Candida humilis*、

*Hanseniaspora uvarum*、*Kazachstania servazzii*のいずれもが生育しないのに対し、*Saccharomyces cerevisiae*はほぼすべてが生育した。しかし、さらに40℃では、全体的に生育が不良になり、42℃である程度生育が認められたのはSKRA1、SHRA1、SORA6、GLE1など数株に限られ、いずれも45℃での生育は認められなかった。今回選別した酵母株では、特に耐熱性の株は得られなかった。

## 7. エタノール産生能試験

比較的生育のいい菌株を選んで、30℃静置培養でのエタノール産生速度を比較した。生育速度が速い株はいずれも *Saccharomyces cerevisiae*である。選抜株24株と、対象として協会酵母 No. 7、SAF 及び丹沢酵母パン種酵母 (TA) を培養した結果を表5に示す。24時間培養と48時間培養での残存グルコース濃度を測定した。グルコース消費速度は菌株によって大きく異なる結果となったが、半数以上の株は協会酵母 No. 7と同程度かそれ以上の消費速度を示した。特にグルコース消費の早かった6株と協会酵母 No. 7については48時間培養後のエタノール濃度を測定した。その結果、いずれの株も8%以上のエタノールを含んでいた。

表5 グルコース20%を含むYPD培地での、グルコース消費量とエタノール産生量

菌株名	培養24h グルコース濃度 (%)	培養48h		
		グルコース濃度 (%)	エタノール濃度 (%)	エタノール濃度 (v/v%)
SSRA1	10.61	4.2		
SSLI5	9.04	1.76		
SKLE3	15.48	11.71		
SHRA1	12.09	4.86		
SFRA1	11.43	5.24		
SORA5	10.22	2.99		
SORA6	5.65	0.27	8.01	10.4
SOLI1	15.32	11.28		
SOHO1	6.28	0.11	8.24	10.7
GRA1	9.75	2.52		
GLE1	5.98	0.05	8.58	11.2
GLI1	12.04	4.77		
GSO1	6.61	0.11	8.97	11.7
GHO1	10.74	3.24		
GHO3	11.21	3.76		
GSA1	11.79	5.82		
GRO1	10.03	2.06		
GRO2	10.52	2.69		
CRA1	6.45	0.52	8.19	10.7
LRA1	11.02	3.68		
LSA1	9.59	1.1		
LZE1	12.2	3.79		
PWH1	9.42	0.8	8.18	10.7
PRY1	14.57	11.17		
No.7	11.13	2.5	7.3	9.5
TA1	10.28	2.74		
SAF3	9.61	1.7		

## 【考 察】

本研究では、「天然酵母パン」の実態を知る一環として、アンケート調査から開始した。60店の「天然酵母パン」店にアンケート調査を行ったが、回収率が悪く、実際に自家で採取した酵母を使用している店がどの程度あるかは明確にはできなかったが、回答が得られた16店のうち9店は自家での採取酵母、6店は市販の「天然酵母」を使用していた。不詳の1店は譲渡されたものとのことで、その前が不明とのことだった。仙台市内外での差もないことから、回答を得られなかった店も同程度と考えると、おおむね表示そのものには間違いはないものと考えられる。

「天然酵母パン」の特徴の一つとして、同時に採取される乳酸菌の影響によって、独特な風味を与えることが多い。今回得られた天然酵母パン種では、サワー種には共通して乳酸菌が多く含まれていたが、その他のパン種に含まれる乳酸菌の割合は様々であった。しかし、乳酸菌の菌種について確認した結果では、漬物などによく使われている菌など普遍的な菌種が多く、特殊な菌種は得られなかった。パン発酵における乳酸菌の役割については種々報告があるが、実際に国内で工業的に大量生産されているパン生地やパン種から得られた乳酸菌についての研究では、酵母菌数の数%程度の乳酸菌が含まれていて、乳酸菌を含まないで発酵したパンでは酵母臭がすること、乳酸菌を含むと生地の進展性がよくなることなどが報告されている[21]。さらに、サワー種などではさらに多くの乳酸菌が含まれ、出来上がったパンの柔らかさにも役立っていると報告されている[22]。今回我々が解析した「天然酵母パン種」では、含まれる乳酸菌の割合は多様で、このことが製品の風味や出来上がりの状態等の多様性に反映されているものと考えられる。

得られた酵母の菌種は、*Saccharomyces cerevisiae*が多かったが、*Candida humilis*、*Hanseniaspora uvarum*、*Kazachstania servazzii*も見いだされた。*C. humilis*の一部は抗真菌薬耐性であった。しかし実際の増殖速度、生育可能温度を調べると、良好な結果が得られたものは全て *S. cerevisiae*であった。*H. uvarum*はワイン発酵の初期には寄与するが、後期には存在しないことが知られていて[23]、これらの酵母がパン発酵では利用されるのは、パンの発酵は二酸化炭素による生地の膨潤であり、同時に産生されるエタノール濃度は低く、アルコール耐性の弱い酵母でも利用可能という特性からくるものと考えられる。

*S. cerevisiae*と同定された株について、さらに分子系統樹による比較を行った。いずれの株も極めて近縁で、清酒酵母の基本的な保存株の一つである協会酵母 No. 7ともよく似ていたが、フランスの会社のパン酵母との違いが大きかった。*S. cerevisiae*の分子系統樹の報告は多数あるが、そのうちのいくつかの結果を比較すると、使用用途による違いよりも地域による違いが大きいのことが明らかとなっている[6, 24–30]。本研究での結果からも、日本国内の *S. cerevisiae*間には遺伝的差異は大きくないと考えられる。

これらの酵母を中心に、エタノール発酵速度を比較したところ、30℃の培養で協会酵母 No. 7よりもエタノール産生速度が速い酵母がいくつか見出された。使用したグルコース濃度20%が全てエタノールに変換されると、エタノール濃度の理論値は10.2%なので、8割以上はエタノールに変換されていることになる。エタノール産生が速かった6株、特に比較的高温での生育が良かったSORA6並びにGLE1は、エタノール生産酵母としての可能性も期待できる。そのほかの株を含めて、今後実際にエタノール産生についての検討を進めていく。

## 【結 語】

「天然酵母パン種」を入手して、含まれている乳酸菌と酵母の菌種同定を行った。乳酸菌は漬物などによく使用されている菌種であった。酵母も多様だったが、発酵性能、発酵温度いずれも良好な株はすべて

*Saccharomyces cerevisiae* であった。発酵性能が良好な株について、今後エタノール産生試験を進める。

## 【謝 辞】

本研究は仙台青葉学院短期大学学長裁量経費による助成を受けて行われました。謹んで感謝いたします。また、本研究を進めるにあたり、多くのパン店にご協力いただきました。あらためて感謝申し上げます。

- [1] 社団法人日本パン技術研究所所長 井上好文：天然酵母表示問題に関する見解. <https://www.panstory.jp/pdf/tennenkobohyoji.pdf>. 2007.
- [2] 松田義弘、工藤晋平、小関敏彦、他：分子系統解析を用いたサクランボ果実からの香気生産 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株の分離. 日本醸造協会誌. 2005；3：199-208.
- [3] 千葉隆司、和宇慶朝昭、貞升建志、他：食品由来酵母の同定における DNA 塩基配列解析法と表現正常試験との比較. 食品衛生学雑誌. 2007；48：1-7.
- [4] 小田有二、山内宏明、田村雅彦：産官学連携による製パン用「とかち野酵母」の開発. 日本食品科学工学会誌. 2012；59：1-5.
- [5] Ebabhi AM, Adekunle AA, Okunowo WO, et al. : Isolation and characterization of yeast strains from local food crops. *J. Yeast & Fungal Res.* 2013；4：38-43.
- [6] 小野奈津子、安田（吉野）庄子、船越吾郎、他：愛知県内の花から分離した酵母の遺伝的多様性と清酒醸造特性. 愛知産業科学技術総合センター研究報告2017, pp70-73.
- [7] 工藤泰良、関淑楓、Koivisto T、他：特別天然記念物「椿山」からの発酵食品用天然酵母の分離と種の同定. 八戸工業高等専門学校紀要. 2017；51：117-121.
- [8] Nuruhayato N, Sugiharto B, Fitriyah I, et al. : Isolation and Identification of Osmophilic Yeasts Isolated from Molasses Sugarcane as Bioethanol Starter. *Adv. Eng. Res.* 2018；172：223-228.
- [9] 赤尾健：ゲノムから見た清酒酵母の系統分化と育種への新たな視点. *科学と生物.* 2014；52：223-232.
- [10] Fernandez-Espinar MT, Llopis S, Querol A, et al. : Molecular Identification and Characterization of Wine Yeasts. *Molecular Wine Microbiology*, Elsevier Inc. 2011, pp111-141.
- [11] 藤本章人：パンと微生物. *モダンメディア.* 2017；63：186-192.
- [12] Urien C, Legrand J, Montalent P, et al. : Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour. *Frontiers in Microbiology*, 2019；10：1-17.
- [13] Carbonetto B, Nidelet T, Guezenec S, et al. : Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*, 2020；8：240-259.
- [14] Jacques N, Sarilar V, Urien C, et al. : Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania humilis* f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016；66：5192-5200.
- [15] Hiraishi A : Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 1992；15：210-213.

- [16] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, 1990, 315-322.
- [17] Oda Y, Mikumo D, Leo F, et al. : Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains by the SUC2 gene sequence. J. Gen. Appl. Microbiol. 2010 ; 56 : 355-358.
- [18] 山口英世 : 真菌の薬剤耐性化の現状は？ そして今後は？ モダンメディア. 2010 ; 56 : 119-138.
- [19] Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, et al. : Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiol. Res. 2002 ; 157 : 267-274.
- [20] 小林正義、川村麻梨子、小林篤、他 : キムチ酵母の分離と圧力感受性変異株の作出. 高圧力の科学と技術. 2013 ; 23 : 59-67.
- [21] 岡田早苗 : パン生地発酵と乳酸菌〔前編〕. 日本乳酸菌学会誌. 1999 ; 9 : 5-8.
- [22] 岡田早苗 : パン生地発酵と乳酸菌〔後編〕. 日本乳酸菌学会誌. 1999 ; 9 : 82-85.
- [23] Schutz M., Gafner J. : Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. J. Appl. Bacteriol. 1993 ; 75 : 551-558.
- [24] Montrocher R, Verner MC, Briolay J, et al. : Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequence. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998 ; 48 : 295-303.
- [25] Ezov TK, Boger-Nadjar E, Frenkel Z : Molecular-Genetic Biodiversity in a Natural Population of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* From “Evolution Canyon” : Microsatellite Polymorphism. Ploidy and Controversial Sexual Status. Genetics, 2006 ; 174 : 1455-1468.
- [26] Li Y, Zhang W, Zheng D, et al. : Genomic Evolution of *Saccharomyces cerevisiae* under Chinese Rice Wine Fermentation. Genome Biol. Evol. 2014 ; 6 : 2516-2526.
- [27] West C, James SA, Davey RP, et al. : Ribosomal DNA Sequence Heterogeneity Reflects Intraspecies Phylogenies and Predicts Genome Structure in Two Contrasting Yeast Species. Syst. Biol. 2014 ; 63 : 543-554.
- [28] Wolters JF, Chiu K, Fiumera HL : Population structure of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. BMC Genomics, 2015 ; 16 : 451-463.
- [29] Stefanini I, Albanese D, Sordo M, et al. : *Saccharomyces* IDentifier, SID: strain-level analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations by using microsatellite meta-patterns. Scientific Report, 2017 ; Article number 15343.
- [30] Nagano H, Inoue E, Inoue-Murayama M, et al. ; Microsatellite Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* in Cooked Bread. Food Analytical Methods, 2018 ; 11 : 1757-1762.