

山幸ブドウから分離した酵母
Hanseniaspora vineae を利用した
食品開発に関する研究

令和4年
(2022)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科
畜産科学専攻博士後期課程
高谷政宏

Research on Food Development Using Yeast
Hanseniaspora vineae Isolated from Wine Grape
“Yamasachi”

2022

Masahiro Takaya

Doctoral Program of Animal Science and Agriculture
Graduate School of
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture,
Obihiro University
of Agriculture and Veterinary Science

目次

I. 緒論	1
II. 山幸ブドウから分離した酵母 <i>Hanseniaspora vineae</i> の諸性質と製パンへの利用	14
1. 緒言	14
2. 実験材料及び方法	15
(1) 酵母の分離	15
(2) 分離した酵母の同定と諸性質の解析	16
(3) 使用菌株	19
(4) 培養方法	19
(5) 液体発酵力測定	20
(6) 製パン試験	21
(7) 揮発成分の分析	22
(8) 可溶性成分と味質の分析	23
(9) 統計解析	24
3. 結果	24

(1) 分離した酵母の同定と諸性質	24
(2) 菌体収量と液体発酵力	28
(3) パンの品質評価	30
4. 考察	36
III. レーズン発酵液を用いた製パン法の開発に関する研究	41
1. 緒言	41
2. 実験材料及び方法	42
(1) 使用菌株	42
(2) レーズン抽出液の調製	42
(3) レーズン発酵液の至適発酵条件の検討	43
(4) 製パン試験	43
(5) 各種成分分析	44
(6) 統計解析	44
3. 実験結果	45
(1) レーズン発酵液の至適発酵条件	45
(2) レーズン発酵液の評価	48

(3) パンの品質評価.....	51
4. 考察.....	55
IV. 製パン用酵母 <i>S. cerevisiae</i> を併用した <i>H. vineae</i> の製パン法の開発に関する研究	58
1. 緒言.....	58
2. 実験材料及び方法.....	60
(1) 使用菌株.....	60
(2) 培養.....	60
(3) 混合培養菌体の評価	61
(4) 製パン試験.....	62
(5) 各種成分分析	63
(6) 再現性	64
3. 実験結果	64
(1) インベルターゼ活性の影響.....	64
(2) 培養菌体を混合使用したパンの評価	66
(3) 混合培養法の評価	71

(4) 混合培養菌体を使用したパンの品質評価	73
4. 考察	77
V. <i>Hanseniaspora vineae</i> を利用したワインの開発に関する研究	80
1. 緒言	80
2. 実験材料及び方法	81
(1) 菌株と培養	81
(2) ワイン醸造適性の評価	81
(3) 試験醸造	82
(4) ワインの発酵経過の解析	82
(5) ワインの品質評価	83
(6) ワインの成分分析	84
3. 実験結果	85
(1) ワイン醸造適性の評価	85
(2) ワインの発酵経過	87
(3) ワインの品質評価	89
4. 考察	95

VI. 総括	100
VII. SUMMARY.....	103
VIII. 参考文献	105

I. 緒論

酵母はその存在が認識される前から人類に貢献してきた微生物である

1)。紀元前 4000 年にはメソポタミア地域において小麦粉と水を捏ねておくと膨らんで美味しいパンができたことや果実類や穀類などの液汁からアルコール飲料が作られていたと記録されている。長い年月を経て、酵母の存在は 1680 年にレーウェンフックが発酵中のビールの顕微鏡観察したことにより初めて確認されたと考えられている。酵母という名前は発酵を産む母という意味で名付けられた。このように酵母は古くから各種発酵食品の製造に関わり、人類に欠かすことのできない微生物である。

酵母は各種アルコール飲料やパンなどの製造に使用される産業用酵母、自然界の果実や花卉などに生息している野生酵母、そして実験室酵母と区別されている²⁾。多くの産業用酵母と実験室酵母は *Saccharomyces cerevisiae* である。実験室酵母は組換え DNA 技術等が容易にできるよう
に育種された菌株であり、モデル真核生物として分子生物学的研究の発展に大きく貢献してきたが、アルコール発酵力が低いなど産業利用の形質には乏しい。一方で、野生酵母には *S. cerevisiae* 以外にも様々な種属の酵母

が含まれており、産業利用のための実用的な形質についても多種多様である。各種発酵食品は野生酵母が製造中に偶然混入したことが起源であり、その発酵食品の製造を繰り返す過程で長い年月をかけてより良い品質の製品が得られる産業用酵母として *S. cerevisiae* をはじめとする *Saccharomyces* 属酵母が選抜されてきた^{3,4)}。この *Saccharomyces* 属には *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* の少なくとも 8 種が含まれる⁵⁾。

1883 年にハンセンが酵母の純粋培養法を確立したことをきっかけに、酵母の培養技術が次々と開発されて、酵母の産業利用の形が変わっていった⁶⁾。通気培養法が開発されて酵母の培養菌体収量が著しく改善し、培地の主原料が製糖工業の副産物である安価な糖蜜に切り替えられて安価に酵母菌体を製造することが可能となり、さらに流加培養法が確立されて従来の回分培養法よりも菌体収量が増加した。1960 年代後半には連続真空脱水機や自動包装機も導入されて効率的な酵母菌体の工業生産が可能になった。純粋培養法の確立以前は製造した発酵食品の一部を次の製造の種とし

て使用するか、もしくは果実や穀類に付着している野生酵母を増殖させて使用するしかなかった。しかし、現代では工業生産された酵母菌体を発酵食品の製造に手軽に利用することができ、これによって安定した品質の製品の製造が可能になったため、各種発酵食品の製法も一新され、それぞれの製造に重要な酵母の形質も明らかになっていった。

清酒の製造において大事な工程は「一麴、二酛（もと）、三造り」と言われている⁷⁾。「一麴」に当たる製麴は蒸米に麴菌を生育させて米麴を製造する工程である。「二酛」にあたる酒母の仕込み工程は、乳酸の存在下において野生酵母や酒造りに有害な菌の発生を抑制しながら目的の清酒酵母 *S. cerevisiae* を培養する工程である。「三造り」に当たる発酵工程は、先に製造した米麴と酒母に蒸米と水を加えて醪として、酒母の乳酸による低 pH と高い酵母菌数を維持して腐敗等の変敗を抑制するため、「添」

「仲」「留」と呼ばれる 3 段階に分けてスケールアップしてアルコール発酵する工程であり、清酒醸造に特徴的な工程として「三段仕込み」と知られている。また、醪中では米麴の酵素による蒸米中のデンプンの糖化と清酒酵母によるアルコール発酵が同時並行するため「並行複発酵」と知られ

ている。このようにして発酵した醪を搾り、酒と酒粕に分けて酒をろ過、60～65 °Cで10分程度の火入れをした後、貯蔵して充填されて出荷される。清酒酵母に特に重要な性質は15 °C以下で醪の発酵が可能な低温発酵性、20%以上に達する高いアルコール生成能、そして風味成分をバランス良く生成して出来た製品の風味が優れていることであり、さらに醪の発酵中に問題になる高泡形成性やビオチン合成能も重要である⁸⁾。

ビールの醸造はまず麦汁の製造から始まる⁹⁾。麦芽やその他のコーンスターチ等の副原料を煮て、原料から麦芽に含まれている酵素アミラーゼやプロテアーゼの作用によりグルコース、マルトース、ペプチドやアミノ酸等を生成させ、ろ液にホップを加えて煮沸して麦汁を製造する。得られた麦汁にビール酵母を加えてアルコール発酵するが、ビールは酵母の発酵形式によって上面発酵ビールであるエールビールと下面発酵であるラガービールに分けられ、上面発酵ビール酵母には *S. cerevisiae* が使用され、下面発酵ビール酵母には *S. pastorianus* が使用される。発酵終了後、熟成と貯蔵を経て、必要に応じてろ過した後充填されて出荷される。ビール酵母に必要な形質として、上面発酵ビール酵母は低温発酵能が弱いことと、発酵

後期に炭酸ガスとともに液の上層に浮上する凝集性が弱いことが挙げられている。上面発酵ビール酵母と対照的に、もう一方の下面発酵ビールは10 °C前後でも発酵可能な低温発酵能があることと、発酵後期に凝集してタンク底に沈降する凝集性が強いことが挙げられている⁹⁾。

ワインの醸造方法は清酒やビールと異なり、糖化の工程を必要としないため比較的単純な工程になるが、主要な二種類のワインである赤ワインと白ワインは原料ブドウ以外にも製法が一部異なる⁷⁾。赤ワインは収穫したブドウを除梗、破碎して果醪とした後、亜硫酸や補糖してから酵母を加えて発酵して、発酵終了後の果醪を圧搾、熟成と滓下げ工程を経て、ろ過して瓶詰される。白ワインは収穫したブドウを先に圧搾して果汁を回収して酵母により発酵する。以降の工程は赤ワインと同一になる。ワイン酵母には *S. cerevisiae* の他にも *S. bayanus* や *S. uvarum* も使用される¹⁰⁾。ワイン酵母に重要な形質は様々挙げられており、例としては殺菌目的で使用される亜硫酸への耐性、アルコール発酵能力や低温発酵性などが挙げられる。

代表的な製パン法としてストレート法、中種法、発酵種法がある⁷⁾。ストレート法は原材料を混捏してパン生地を作り、一次発酵をしてベンチタ

イムをとり、成形した後に二次発酵して焼成する。中種法はパン生地の一部を混捏して中種を作り、この中種を発酵した後、残りの原材料を加えて混捏して本捏生地を作り、以降の工程はストレート法と同一である。ストレート法は作業時間が短く手軽であるが、日持ちしにくい特徴があり、中種法は作業時間が長くなってしまいが、ふくらみが良く、日持ちも長くなる特徴がある。これらの製法は先に述べた発酵食品の製法よりも圧倒的に発酵時間が短いため、短時間でアルコール発酵をしてパン生地を膨張する能力がパン酵母として最も重要な形質である²⁾。また、ストレート法や中種法に使用するパン酵母は *S. cerevisiae* である。最後に、発酵種法は穀類や果物に生息している野生酵母などの微生物を利用した製法であり、使用する原料によって様々な種類がある^{7,11,12)}。例としては、ビール醸造にも使用するホップとジャガイモなどのでんぷん質により作るホップス種、ライ麦粉から作るサワー種、小麦粉とライ麦粉から作るフランス伝統のルヴァン種、レーズンや砂糖などから作るレーズン種が挙げられる。いずれの製法も仕込みから製パンに利用するまで3~8日間と時間がかかり、その間も毎日作業しなければならないため工業生産されたパン酵母を利用する

よりも非常に手間暇がかかるが、発酵種の原料に由来する風味や長時間の発酵により形成された風味などをパンに付与することができ、個性豊かなパンを製造することができる。工業生産されたパン酵母の利用は安定した品質のパンの製造や短時間でパンが出来上がるという作業性の向上をもたらした一方で、発酵により生成する風味の差別化が困難になるという課題を生じた。

既存の産業用酵母に頼らず、新たに分離した酵母を産業に利用する試みがされてきた¹³⁻¹⁵⁾。新たに分離した酵母はまず炭素化合物の資化性、糖の発酵性や生育温度、光学顕微鏡による形態観察など分類学的性質を調べ、DNAの塩基配列情報を解析して同定する。酵母をはじめとする真核生物の属以上の系統分類には18S rRNAの塩基配列情報が利用されるが、近縁な種間では塩基置換数が少なくなるため、同定の精度が低下する。そのため、種の同定や近縁種の判別は塩基置換頻度の高いrRNA D1/D2領域やITS (Internal Transcribed Spacer) 領域が利用される。同定した菌種の食経験や安全性などを考慮してから、先に述べた各種発酵食品の製造に重要な形質を調べて、それぞれの発酵食品の試作を行い、分離株の有用性を判

定する。そして、必要に応じて分離株をさらに育種改良する。Oda ら¹⁶⁾は北海道十勝地域に自生していた果実や花 215 点のうちエゾヤマザクラの果実からパン生地の発酵能力に優れた *S. cerevisiae* AK46 を分離し、この酵母は日本甜菜製糖株式会社から製パン用ドライイースト「とち野酵母」として商品化された。この商品は 2010 年に発売され、十勝地域に自生していたエゾヤマザクラに由来する酵母であるというストーリー性や高い製パン適性が好評のため 2021 年現在も継続して販売されている。

Mikumo ら¹⁷⁾は *S. cerevisiae* AK46 の製パン性をさらに向上するため、小麦粉中の主要な糖であるマルトースの発酵を改善するため、マルトースによるカタボライト抑制が解除されて AK46 よりも製パン性が向上した MCD4 を取得したと報告している。これら自然界から分離した酵母を産業利用に適応する研究はいずれも *S. cerevisiae* が利用されていた。

アルコール飲料やパンの産業利用は *S. cerevisiae* が一般的に使用されている¹⁸⁾。そのため、発酵により生じる風味を著しく差別化することが困難である。なぜなら、同一種が発酵により生成する代謝産物は基本的に同じ代謝経路によって生成されるためである。したがって、新規に分離した *S.*

cerevisiae を各種発酵食品の製造に利用しても既存の産業利用酵母と発酵により生成する風味と著しく差別化することは困難であると推察された。

そこで、近年では製品の風味の差別化のために Non-Conventional 酵母または Non-*Saccharomyces* 属酵母と呼ばれる一般的に産業利用されていない酵母が注目されている。たとえば原料を殺菌処理しない自然なワイン製造工程では、高いエタノール生産性とエタノール耐性を特徴とする *S. cerevisiae* が発酵の後期に優勢になるものの、発酵の初期段階では *S. cerevisiae* 以外のさまざまな酵母も生育しており、これらの Non-*Saccharomyces* 属酵母と *S. cerevisiae* を同時に接種すると、揮発性化合物の量が増加し、最終製品の品質の多様化、さらには品質の改善に貢献すると報告されている¹⁹⁻²²⁾。この Non-*Saccharomyces* 属酵母の一種である *Hanseniaspora vineae* は酢酸 2-フェニルエチルや酢酸エチルなどの酢酸エステルを多量に生成してフルーティーな香りのワインが得られると報告されていた²³⁾。また、Zhou ら²⁴⁾ は *H. vineae* がスクロースからのガス発生力はほとんど検出されなかったものの、味と香りに優れたパンが得られたと報告していた。しかし、彼らは高いストレス耐性と豊かな香りの特徴す

る *Kazachstania gamospora* と *Wickerhamomyces subpelliculosus* に注目しており、スクロースを発酵しないという製パン利用への大きな課題を抱えている *H. vineae* についてはあまり注目していなかった。

北海道十勝地域は農業が盛んな地域であり、酵母とも関わりのある地域である。十勝地域の農業はじゃがいも、豆類、甜菜、小麦が代表的な作物である。収穫された甜菜は砂糖等の製造に利用され、この製造の副産物である糖蜜は酵母等の微生物の培養基材にもなる。一方で、2019年の小麦の国内生産量は約104万tである²⁵⁾のに対して、北海道全体の小麦生産量は約68万tであり、国内生産量の65%を占めている²⁶⁾。北海道内でも十勝地域の小麦生産量は約25万tであり、十勝地域が日本国内で最も高い小麦生産量である²⁶⁾。小麦はパン、麺類や菓子類等にも加工されて食べられるが、2014年以降、日本の伝統的な主食である米よりもパンへの支出額が高くなっている²⁷⁾。また、ワインをはじめとする果実酒製造場数が増加している²⁸⁾。国税庁課部酒税課によると北海道では2018年3月31日時点で37場あり、これは全国の約11%に相当する。十勝地域では1963年に国内最初の自治体経営によるワイン醸造を始めた池田町の十勝

ワインのほか、2019年からは新たに3つのワイナリーも開設されている。これらパンやワインの製造に不可欠な原料のひとつが酵母である。

本研究は Non-*Saccharomyces* 属酵母である *H. vineae* によって既存の産業用 *Saccharomyces* 属酵母と差別化された高品質のパンとワインの製法及び培養方法を検討した。酵母の分離源は国際ブドウ・ワイン機構に国際品種登録された十勝地域の貴重な資源である池田町ブドウ・ブドウ酒研究所のワイン用ブドウ「山幸」を使用した。分離した TW15 の炭素化合物資化性、糖発酵性、生育温度や rRNA D1/D2 領域と ITS 領域の塩基配列情報など菌学的諸性質を調査した。その結果、TW15 をワイン醸造に利用すると風味の良い製品が得られると報告されている¹⁹⁻²²⁾ *H. vineae* と同定したが、TW15 はスクロースを発酵しなかった。そこで、安価な糖源である異性化糖を想定したフルクトース：グルコース=55：45 の糖を使用して製パンを行い、市販パン酵母と比較評価した。その結果、TW15 は市販パン酵母よりも膨らみが良く、特に香りが差別化されたパンが得られた。

発酵種の一つであるレーズン種はレーズン特有の風味や甘味をパンに付与し、さらにクラストを甘く、香ばしく焼き上げる製法である¹²⁾。そし

て、レーズンが含有している糖は TW15 が発酵可能なフルクトースとグルコースである。そこで、異性化糖を使用せずにスクロースを発酵しない TW15 を製パンに利用するため、レーズン種を応用した製パン法を検討した。その結果、異性化糖を使用した製パンと同様に市販パン酵母よりも膨らみが良く、特に香りが差別化されたパンが得られた。

酵母菌体の工業生産は製糖工業の副産物である糖蜜が使用される。この糖蜜の主要な糖はスクロースであるため、TW15 は糖蜜を利用して培養することができない。また、TW15 は製パンに最も一般的に使用されるショ糖であるスクロースを発酵することができない。一方で、*S. cerevisiae* はスクロースを分解する酵素インベルターゼを合成する。そこで、TW15 の培養とスクロースを配合したパン生地発酵のふたつの課題を解決するため、スクロース存在下における *S. cerevisiae* との混合培養法とこれにより得られた混合培養菌体を使用したスクロース配合の製パン法を検討した。その結果、TW15 が高比率で存在する混合培養菌体を回収し、スクロース配合パン生地から TW15 特有の香りを備えたパンが得られた。

TW15 の分離源であるワイン用ブドウ「山幸」は国際ブドウ・ワイン機構に国内 3 例目となる品種登録がされ、今後海外輸出が期待されているワインの原料であった。TW15 の菌種である *H. vineae* はワイン醸造へ利用すると有用であると多数報告されており¹⁹⁻²²⁾、山幸ワインのさらなる高品質化に TW15 が有用である可能性が考えられた。そこで、TW15 のワイン醸造適性を調査して、山幸ブドウを使用した実規模スケールの試験醸造により製造したワインの品質を評価した。その結果、TW15 は亜硫酸耐性とアルコール耐性を備えており、TW15 により製造したワインは市販ワイン用酵母よりも華やかな香りを特徴とするエステル化合物の合成に優れ、総合的に風味の優れたワインが得られた。

II. 山幸ブドウから分離した酵母 *Hanseniaspora vineae* の諸性質と製パン

への利用

1. 緒言

製パンにおける酵母の役割は、第一に発酵により炭酸ガスを放出して生地を膨らませることであるが、生成する代謝産物によりパンの風味を形成するという側面もある。しかし、一般に製パンに利用される酵母は *S. cerevisiae* 菌株であり、その発酵経路は基本的にアルコール飲料の発酵過程においても発生する糖代謝の経路と同じである。そのため、同一種の *S. cerevisiae* 菌株を使用した製パンでは、発酵により生成する風味の差別化に限界があった。

パンに良好な風味を形成する新たなパン用酵母菌株を探索する過程で、池田町独自のワイン用ブドウ「山幸」から *H. vineae* TW15 を分離した。その菌株の諸性質を明らかにし、産業利用への有用性を検証するために製パンへの利用を試みた。

2. 実験材料及び方法

(1) 酵母の分離

分離源としたワイン用ブドウ品種「山幸」は、池田町のブドウ・ブドウ酒研究所で選抜育成された醸造用品種「清見」と山ブドウを交配することによって開発された低温耐性品種であり、優れた品質のワイン原料である²⁹⁾³⁰⁾。このブドウを2016年10月に同研究所のブドウ園において収集した。

そして、このブドウから製パンに有用な酵母菌株を分離するため、小麦粉の主要な糖であるマルトースとパン生地に一般的に配合されるスクロースを使用した集積培養を行った。まず一次集積培養として、6つのブドウ搾汁液それぞれ7.0 mLずつに、それぞれ10.0% マルトース 1.0 mL, 2.0% プロピオン酸ナトリウム 1.0 mL, クロラムフェニコール 1.0 mg(終濃度0.01%) を含むエタノール 1.0 mL を混合し、30°Cで3日間培養した。この培養液0.05 mLを、20% スクロース, 1.0% 酵母エキス, 2.0% ポリペプトン, 0.2% プロピオン酸ナトリウム及び0.01% クロラムフェニコールから成る二次集積培地に接種して、30 °C, 6日間培養した培養液を1.0% 酵母エキス, 2.0% ポリペプトン, 2.0% グルコース, 2.0% 寒天を含むYPD寒

天培地に画線塗抹した。YPD 寒天培地は酵母の培養に用いられる最も一般的な培地のひとつである。

(2) 分離した酵母の同定と諸性質の解析

分離された酵母の生理学的特性とリボソーム D1 / D2 ドメイン及び ITS 領域の解析は、Kurtzman ら³¹⁾ や Oda ら¹⁶⁾ の方法で実施した。生育温度は菌体を滅菌蒸留水 25 μ L に懸濁し、YPD 寒天培地に接種してそれぞれ 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C で培養後、目視により増殖を確認して判定した。炭素化合物の資化性は 0.2% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids, 0.1% グルコースの培地により 30 $^{\circ}$ C, 3 日間飢餓培養し、回収した菌体を滅菌蒸留水で洗浄して 0.2% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids, 0.1% 表 II-1 記載の各種炭素化合物, 0.6% 寒天に 50 μ L 塗布して 30 $^{\circ}$ C, 7 日間培養して目視により増殖を確認して判定した。糖の発酵性は 0.15% 酵母エキス, 0.5% ポリペプトン, 0.002% BTB (ブロモチモールブルー), 2.0% 各種糖 (グルコース, ガラクトース, スクロース, マルトース, ラクトース, ラフィノース, トレハロース, メリビオース) 3 mL をダーラム管を加えた

試験管に調製し，YPD 寒天培地で培養した菌体を滅菌蒸留水 0.5 mL に懸濁してその懸濁液 50 μ L を接種して 30°C，7 日間発酵した後，気泡の発生と BTB の黄変を目視で確認して判定した。

表 II-1. 炭素化合物資化性試験に用いた化合物

1.グルコース	11.メチル- α -グルコシド	21.エタノール
2.イヌリン	12.可溶性でんぷん	22.グリセロール
3.スクロース	13.セロビオース	23.リビトール
4.ラフィノース	14.サリシン	24.D-マンニトール
5.メリビオース	15.L-ソルボース	25.ミオイノシトール
6.ガラクトース	16.L-ラムノース	26.コハク酸
7.ラクトース	17.D-キシロース	27.クエン酸
8.トレハロース	18.L-アラビノース	28.D-グルコサミン
9.マルトース	19.D-アラビノース	
10.メレジトース	20.D-リボース	

(3) 使用菌株

H. vineae の 7 菌株 (NBRC 1412, NBRC 1415^T, NBRC 1416, NBRC 1753, NBRC 1754, NBRC 10226, NBRC 100790) とパン用酵母 *S. cerevisiae* 3 菌株 (NBRC 2043, NBRC 2044, NBRC 2375) は, 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 (NBRC) から入手し, これらに加えて市販の製パン用圧搾酵母から分離した *S. cerevisiae* HP467 を実験に使用した¹⁶⁾。

(4) 培養方法

各菌株を 50 mL 三角フラスコ中の YPD 培地 10 mL で 30 °C, 24 時間, 150 rpm で振盪培養し, この種培養液 0.6 mL を 300 mL またはバッフル付き三角フラスコ中の本培地 (1.0% バクト酵母エキス, 2.0% バクトペプトン, 0.2% リン酸二水素カリウム, 0.1% 硫酸マグネシウム七水和物, 0.05% アデカノール LG-294, 2.0% グルコース) 60 mL に接種して 24 時間, 30 °C, 150 rpm で振盪培養した。

(5) 液体発酵力測定

培養後の菌体を遠心分離で回収し、蒸留水で2回洗浄してから容量7.0 mLになるように懸濁した。この懸濁液の1.0 mLを105 °C、2時間乾燥させて菌体収量を算出するとともに、乾物重量200 mg/5 mLの菌体懸濁液を調製した。

液体発酵力の測定に際して、100 mL三角フラスコに糖（後述）2.5 gとアスパラギン一水和物0.25 gを測り取り、5.0 mL塩類溶液（15.0 g/L リン酸二水素ナトリウム二水和物, 10.0 g/L 硫酸マグネシウム七水和物, 4.0 g/L 塩化カリウム）、5.0 mL ビタミン溶液（1.0 mg/L チアミン塩酸塩, 1.0 mg/L ピリドキシン塩酸塩, 1.0 mg/L ニコチン酸）、3.0 mL クエン酸緩衝液（クエン酸三ナトリウム二水和物10.0 gを溶解し、10% クエン酸一水和物溶液でpH5.5に調整後、100 mLに定容）を添加し、容量が20 mLになるように蒸留水を加えて溶解した。この液体培地に上記の5 mL菌体懸濁液を混合し、10 N 硫酸を入れた発酵管を取り付け、30 °Cの恒温庫内で3時間往復振盪（80 rpm）し、発酵前後の重量差を液体発酵力（mg/3h）として測定した。なお、*H. vineae* 菌株はスクロースを発酵で

きないため、安価に市販されている異性化糖を想定したフルクトースとグルコースの混合物（55：45）を使用した。

（6）製パン試験

種培養液 1.0 mL を 500 mL バッフル付き三角フラスコ中の本培地 100 mL に接種した以外は上記と同様の方法で培養した。培養後の菌体は遠心分離で回収し、蒸留水で 2 回洗浄してから乾燥させた吸収板の上に数分間置いて培養湿菌体を得た。培養菌体の固形分は約 30%になるが、一部を乾燥させて正確な数値を算出し、以下の実験では固形分 33%に換算した重量として培養菌体を製パン試験に使用した。

製パンは強力小麦粉（カメリヤ；日清フーズ株式会社）250 g，無塩バター（よつ葉乳業株式会社）10.0 g，果糖（日新製糖株式会社）9.35 g，ブドウ糖（日本ガーリック株式会社）7.65 g，スキムミルク（雪印メグミルク株式会社）6.0 g，食塩 5.0 g，酵母培養菌体 7.0 g（固形分 33%換算），蒸留水 170 mL をホームベーカリー（SD-BMT1000；パナソニック株式会社）に投入し，食パンモード（所要時間：約 4 時間）で焼成までの

工程を自動で行った。焼成したパンは室温で放冷後、重量と菜種置換法によって容積を測定して比容積 (ml/g) を算出した。また、3名のパネルで簡易的に官能評価を行い、パンの外観 (クラスト) の色、内層 (クラム) の色、味、香りについて感じられた特徴を記述した。

(7) 揮発成分の分析

ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP 2010 Plus (島津製作所) を使用し、SPME (Solid Phase Micro Extraction, 固相マイクロ抽出) 法で分析した³²⁾。2 cm ずつスライスした3枚のパンローフからそれぞれクラム 1.0 g を切り出し、15 mL 分析用ガラスバイアルに入れて、分析時まで 20 °C で保管した。この試料を室温で解凍後、40 °C のインキュベーターで 5 分間加熱して平衡化し、ヘッドスペースガスを SPME ファイバーに 30 分間吸着させ、ガスクロマトグラフ質量分析計のインジェクションポートで 250 °C 1 分間、SPME ファイバーを加熱することにより香気成分を脱離して分析した。SPME ファイバーは DVB/Caboxen/PDMS 50/30 μm (Supelco, Inc), カラムは InertCap 1 (ジーエルサイエンス株式会社) を

使用し、流速は 1.4 mL/分、カラム温度は 36 °C で 10 分間保持した後、6 °C/分で 220 °C まで昇温した。各成分について全ピーク面積の合計に対する比率を算出した。

(8) 可溶性成分と味質の分析

別々のパンスライスから取り出した 3 個のクラム 5.0 g にそれぞれ蒸留水 20 mL を添加し、ミルサーで 1 分間混合した溶液を遠心分離後、上清をろ過して試料溶液として分析に使用した。

各試料溶液の味質を味認識装置 TS-5000Z を使用してメーカーのマニュアルに従って分析し、得られた出力値を酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コクの 8 つの味質のスコアに換算した³³⁾。遊離アミノ酸はトリクロロ酢酸処理によりタンパク質を除去し、フェニルイソチオシアネートの誘導体化処理後に測定した³⁴⁾。各試料溶液の有機酸と発酵性糖は高速液体クロマトグラフィーにより分析した^{35, 36)}。

(9) 統計解析

すべての実験は独立して 3 回実施し、得られたデータは平均値±標準偏差で表した。また得られたデータは *student* の t 検定により有意差を検定した。

3. 結果

(1) 分離した酵母の同定と諸性質

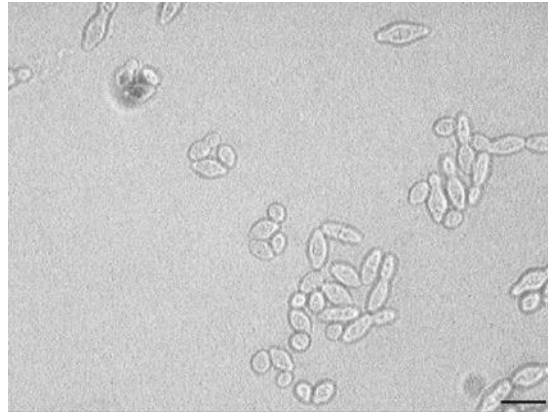
ワイン用ブドウ「山幸」から集積培養により有用酵母の分離を試みた。6 日間の二次集積培養中に、6 つの培養液のうち 5 つの培養液の表面に膜が現れ、目に見える膜を形成しなかった 1 つの培養液を YPD 寒天培地に画線塗抹した。そして、現れた大きなコロニーを TW15 株として分離し、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の特許微生物寄託センター（NPMD）に NITE P-02881 として寄託した。

細胞は $4\sim 6\ \mu\text{m} \times 8\sim 12\ \mu\text{m}$ の短突起型であり、双極出芽（図 II-1）により増殖し、温度は $20\sim 30\ ^\circ\text{C}$ で増殖したが、 $37\ ^\circ\text{C}$ では増殖しなかった。

この株はグルコースを著しく発酵したが、ガラクトース、スクロース、マル

トース、ラクトース、ラフィノース、及びトレハロースは発酵しなかった。

炭素化合物の資化性は、グルコース、マルトース、セロビオース、及びサリシンと限定的であった。18S-26S の塩基配列情報は、DDBJ / EMBL / GenBank アクセッション番号 LC474406 で登録した。これらの表現型の特徴とリボソーム D1 / D2 ドメイン (DDBJ / EMBL / GenBank アクセッション番号 KY107860) の配列の相同性から TW15 株を *Hanseniaspora vineae* と同定した³⁷⁾。18S-26S rDNA スペーサー領域の塩基配列に基づく系統樹を作成したところ (図 II -2), *H. vineae* 標準株である CBS 2171 の塩基配列と比較して、5 塩基が異なっていた。



図II-1. ワイン用ブドウ「山幸」から分離したTW15の細胞形態

YPD 培地で 30 °C, 24 時間培養した細胞を観察した。図右下のスケールは 10 μ m を表している。

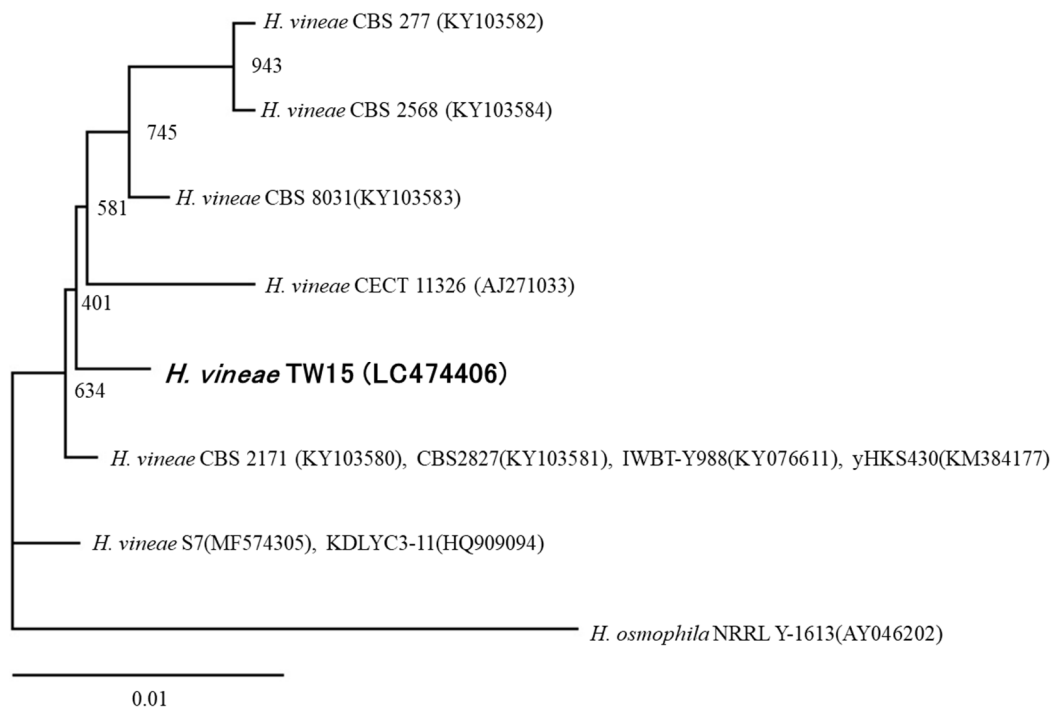


図 II-2. ITS 領域の塩基配列から近隣結合法によって作成した系統樹

Hanseniaspora osmophila はアウトグループとして使用した。DDBJ / EMBL / GenBank アクセション番号は括弧内に示した。ブートストラップ値は 1000 ツリーから計算した。

(2) 菌体収量と液体発酵力

菌体収量は酵母菌体を安価に製造するためには高いことが望ましい。一方の液体発酵力は製パン用酵母の形質として最も重要なパン生地の発酵力を推定する方法である。試験した *H. vineae* 全 8 菌株の菌体収量はいずれも *S. cerevisiae* 菌株よりも低かった。*S. cerevisiae* 菌株の乾燥菌体による菌体収量はおおよそ 660 mg/60 mL であったのに対して、*H. vineae* はおおよそ 230~330 mg/60 mL であった。しかしながら、TW15 は NBRC1415, NBRC1753, NBRC10226 とともに菌体収量が 300 mg/60 mL よりも高く、同種のなかでは比較的高い菌体収量であった。一方の液体発酵力は、菌体収量が著しく低かった NBRC1412 と NBRC100790 は試験しなかったが、これら以外の *S. cerevisiae* を含めた他のすべての菌株よりも TW15 が高い液体発酵能力を有していた (表 II-2)。

表 II -2. 菌体収量と液体発酵力

菌種	菌株	菌体収量 (乾燥菌体 mg /60 mL)	液体発酵力 (mg/3 h)
	TW15	315 ± 7	484 ± 18
	NBRC1412	233 ± 11	-
	NBRC1415 ^T	322 ± 7	420 ± 32
<i>Hanseniaspora vineae</i>	NBRC1416	271 ± 8	322 ± 33
	NBRC1753	299 ± 4	418 ± 25
	NBRC1754	273 ± 0	372 ± 7
	NBRC10226	327 ± 4	363 ± 55
	NBRC100790	243 ± 11	-
	HP467	681 ± 11	372 ± 23
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NBRC2043	670 ± 15	359 ± 15
	NBRC2044	679 ± 0	340 ± 18
	NBRC2375	663 ± 4	364 ± 9

NBRC1412 と NBRC100790 の菌体収量が著しく低かったため、液体発酵力測定は実施しなかった。

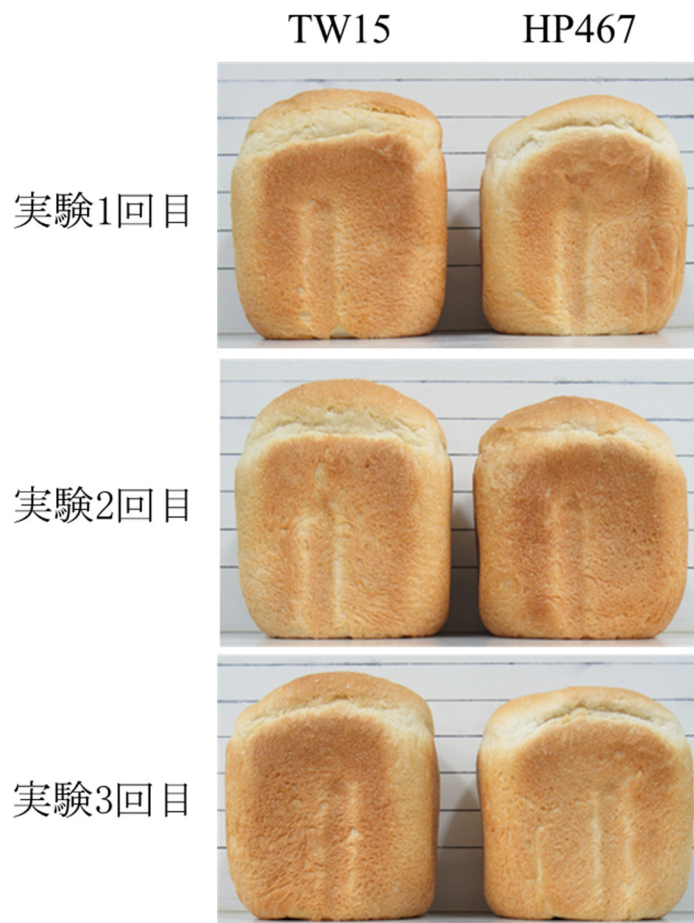
(3) パンの品質評価

TW15 で作成したパンの品質を HP467 と比較した。その結果、TW15 の比容積は 4.62 ± 0.03 mL/g であり、*S. cerevisiae* HP467 の 4.35 ± 0.02 mL/g よりも有意に大きかった (図 II-3)。また、3 名のパネルによる簡易的な官能評価では、両方のパンの外観や質感は類似しているが、TW15 を発酵に用いたパンは明らかに香りが好ましく、具体的には乳製品の香り増強と華やかな香りとコメントされた。また、味もわずかに異なると評価した。そこで、パンの揮発性成分、味質、可溶性成分について分析した。

パンのサンプルから合計 17 の揮発性化合物を確認し、これらのうちアセトイン、酢酸 2-フェニルエチル及び酢酸は、TW15 を発酵に用いたパンが HP467 の 2 倍を超えるレベルで含有していることが分かった (表 II-3)。これらの特徴的な化合物が簡易的な官能評価のコメントにあった乳製品の香り増強と華やかな香りに寄与したと推察された。

味認識装置による試料溶液の味質評価では旨味、旨味コク、塩味、苦味、雑味の 4 つの味質の強度値に有意な差が認められたが、ヒトが強度差を識別するために必要とされる 1.0 以上の数値の差異³³⁾は得られなかった

(表Ⅱ-4)。可溶性成分として抽出液中にクエン酸と乳酸は検出されず、総遊離アミノ酸、コハク酸、及び酢酸の含有量に有意な差が認められた(表Ⅱ-5)。



図II-3. TW15 と HP467 を発酵に用いたパンの外観
独立して3回実施した実験結果を上から順に表した。

表 II-3. TW15 と HP467 を発酵に用いたパンの揮発成分

化合物	相対面積 (%)		面積比 (TW15/HP467)	P値
	TW15	HP467		
アセトイン	9.985 ± 0.928	0.434 ± 0.132	23.01	**
イソアミルアルコール	5.615 ± 0.328	7.681 ± 1.114	0.73	**
イソ酪酸	0.147 ± 0.055	0.242 ± 0.047	0.61	**
カプリル酸	0.079 ± 0.055	0.048 ± 0.031	1.64	
カプロン酸	0.136 ± 0.066	0.107 ± 0.024	1.27	
吉草酸	0.053 ± 0.016	0.055 ± 0.013	0.97	
酢酸	1.834 ± 0.160	0.650 ± 0.151	2.82	**
酢酸 2-フェニルエチル	0.928 ± 0.055	0.165 ± 0.155	5.62	**
ジアセチル	0.124 ± 0.038	0.000 ± 0.000	-	**
ドデカン	0.155 ± 0.038	0.093 ± 0.029	1.67	**
フェネチルアルコール	5.440 ± 0.459	8.087 ± 0.827	0.67	**
フルフラール	0.022 ± 0.006	0.018 ± 0.009	1.23	
ベンズアルデヒド	0.456 ± 0.058	0.229 ± 0.086	1.99	**
ヘキサノール	0.230 ± 0.110	0.185 ± 0.076	1.24	
2-ペンチルフラン	0.097 ± 0.014	0.058 ± 0.010	1.66	**
酪酸イソアミル	0.057 ± 0.008	0.057 ± 0.009	1.01	

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表II-4. TW15 と HP467 を発酵に用いたパン抽出液の味質評価結果

味	スコア		P値
	TW15	HP467	
旨味	5.37 ± 0.04	5.45 ± 0.03	**
旨味コク	2.07 ± 0.06	1.92 ± 0.09	**
塩味	2.91 ± 0.04	2.97 ± 0.05	*
苦味雑味	1.90 ± 0.03	1.96 ± 0.02	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表 II-5. TW15 と HP467 を発酵に用いたパン抽出液の可溶性成分

化合物	含有量 (mg/乾物 100 g)		P 値
	TW15	HP467	
総遊離アミノ酸	214 ± 6	208 ± 1	*
有機酸			
酢酸	167 ± 6	83 ± 6	**
コハク酸	17 ± 2	63 ± 7	**
糖			
フルクトース	662 ± 196	800 ± 126	
グルコース	41 ± 80	0 ± 0	
ラクトース	1,370 ± 84	1,327 ± 68	
マルトース	3,423 ± 163	3,235 ± 155	
スクロース	237 ± 42	0 ± 0	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

4. 考察

製パン用酵母菌株として適性の高い、すなわちマルトースとスクロースを強力に発酵可能な酵母菌株を分離することを目的としたため、これらの糖を含む培地で集積培養を行い、グルコース含有培地で酵母を単離した。

しかし、分離した TW15 はマルトースもスクロースも発酵することができなかった。これは一次集積培養ではマルトースを追加しても搾汁液に由来するグルコースで生育し、二次集積培養では共存した産膜酵母などの作用によりスクロースから加水分解されて生成した単糖を利用して増殖したためと考えられた。

TW15 を工業的に製パン用酵母菌株として利用するためには、菌体収量が低いこと、スクロースが発酵できないこと、主にこのふたつの課題を解決する必要がある。マルトースを発酵することもパン酵母には望ましいが、食パンなどをストレート法で製造する場合はスクロースを発酵してパン生地を膨張し、マルトースは利用されずに発酵が完了するため、マルトース発酵能は必須の能力ではない。前者の菌体収量については培養温度、原料の種類や流加培養の条件の検討による改善の余地があり、後者のスクロー

スを発酵しない課題については今回の製パン試験のように例えば安価な異性化糖に糖源を置き換えることによって解決することが可能である。以上のことから TW15 が新たな製パン用酵母菌株として産業利用できる可能性が示唆された。

TW15 はスクロースとマルトースを消費せず、TW15 によって消費された糖の総量は HP467 によって消費されたものよりも少なかった（表 II-5）。パン生地的气体保持性が変わらない場合、气体の生産量がパンの膨らみを決定する。本研究ではそれぞれの气体保持性の測定を行わなかったが、TW15 は HP467 に比べて発酵により消費した糖が少なかったにも関わらず、TW15 によるパンのほうが HP467 のものよりも比容積が大きかった。この原因の 1 つとして、TW15 を発酵に用いたパンは焼成中に 2-アセト乳酸からアセトインへ変換する過程で炭酸ガスが発生する³⁸⁾。この炭酸ガスによって比容積の大きいパンが得られたということが考えられた。

TW15 と HP467 の味覚スコアの差と可溶性成分の含有量の差は、仮に疎水性の高い物質が十分に抽出されていなかったとしても、非常に小さい

ものであった。したがって、簡易的な官能評価の結果は揮発性化合物の寄与が大きいものと推察された。

TW15 を発酵に用いたパンの特徴的な揮発性化合物のうち、酢酸 2-フェニルエチルと酢酸はパンの品質に影響することが報告されており、酢酸は一定の量まではパンの香りを改善することが示唆されているが³⁹⁾、濃度が高すぎると酸臭や酸味に伴うパンの品質に悪影響を及ぼすことが予想される。もう一方の酢酸 2-フェニルエチルはバラや花様の香りであり、ワインの発酵でも同様に検出されている^{40,41)}。 *H. vineae* は *S. cerevisiae* と比較してベンゼン系化合物を合成する能力が高いため、芳香族中間体を生成する⁴²⁾。 *H. vineae* のゲノムにおいて、芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする *ARO8* と *ARO9* 遺伝子及びフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする *ARO10* が複製され、酢酸 2-フェニルエチルとフェニルプロパノイドの生産を促進したことが報告されている⁴³⁾。今回の実験では、*ARO10* にコードされたデカルボキシラーゼによって、フェニルピルビン酸から合成された 2-フェニルエチルアルコールが酢酸 2-フェニルエチルに変換されたことを示唆している。

TW15 を発酵に用いたパンには HP467 のものよりもはるかに多くのアセトインが含まれていた。アセトインとジアセチルの形成は、バター風味を増強することによってサワー種やパンの香りをより好ましいものに変えると報告されている⁴⁴⁾。また、ワイン醸造に関与していた

Hanseniaspora 属と *Kloeckera* 属の短突起型酵母もワイン用 *S. cerevisiae* 株よりもはるかに多くのアセトインを生産したと報告されている⁴⁵⁾。ジアセチルからアセトインに変換される過程で NADH が NAD に酸化されるが、アセトアルデヒドからエタノールに変換される過程でも同様に NADH が NAD に酸化される。短突起型酵母は *S. cerevisiae* よりもエタノール耐性が低いため、アルコール発酵ではなくアセトインを合成することで NAD と NADH の細胞内バランスを保ち、生存している可能性が考えられた。

本研究によってワイン用ブドウ「山幸」から新たに分離した酵母 *H. vineae* TW15 を分離した。TW15 はスクロースやマルトースを発酵しないが、異性化糖をパン生地に配合することで製パンに利用することができ、従来の *S. cerevisiae* と差別化された乳製品の香りと華やかな香りを特徴とするパ

ンが得られる有用な菌株であると考えられた。

Ⅲ. レーズン発酵液を用いた製パン法の開発に関する研究

1. 緒言

第Ⅱ章においてワイン用ブドウ「山幸」から酵母 *H. vineae* TW15 を分離し、製パンに利用すると市販のパン酵母菌株と比較して膨らみが良く、香りの良いパンが得られることが分かった。しかし、TW15 はスクロースを発酵することができないため、パン生地配合に一般に使用されるショ糖を果糖ぶどう糖液糖などの異性化糖に置き換える必要があった。このような異性化糖はショ糖を酵素処理することにより製造されることから人工的な甘味料と考えると敬遠する消費者もいるため⁴⁶⁾、異性化糖を使用しない製パン法も開発することが望ましいと考えられた。

近年では美味しいパンの訴求として個々のベーカリー独自の天然酵母や自家製発酵種を掲げる事業者も多い。この自家製発酵種のひとつにレーズン種が挙げられる⁴⁷⁾。レーズン種は高糖濃度条件下にレーズンを置くことで、レーズンに付着している浸透圧耐性とエタノール発酵力の高い酵母を優先的に増殖させて製パンに利用する方法であり、このレーズンに含まれている糖は TW15 が発酵可能なフルクトースとグルコースであるため

TW15 の製パンにも応用可能であると考えられた。

本章では，異性化糖を使用しない TW15 の製パンを開発するため，レーズン種を応用した TW15 を発酵に用いたレーズン発酵液を用いた製パン法の開発を検討した。

2. 実験材料及び方法

(1) 使用菌株

ワイン用ブドウ「山幸」から分離した *H. vineae* TW15 と，市販パン酵母である *S. cerevisiae* HP467 を使用した。

(2) レーズン抽出液の調製

オイルコートがされていない市販レーズン（イオン株式会社）5～30 g をミルミキサーで蒸留水 100 mL とともに均質化し，85 °C で 30 分間低温殺菌した。この殺菌によりレーズンに由来する酵母・カビ，一般生菌数がそれぞれ PDA 培地，SPC 培地による検出限界以下であることを確認した。

(3) レーズン発酵液の至適発酵条件の検討

レーズン抽出液にあらかじめ 150 rpm で振盪しながら 30 °C で 24 時間培養した 1.0 mL の種培養液 (0.67% Yeast nitrogen base without Amino Acids, 2.0% グルコース) を接種した。静置条件下 25 °C で数日間発酵した後、発酵液をパン生地発酵力測定及び製パン試験に使用した。また、レーズン発酵液は 24 時間毎にサンプリングし、PDA 培地による生菌数測定、第二章と同一手法による高速液体クロマトグラフィーによる糖濃度分析及び SPME を使用したガスクロマトグラフ質量分析計による揮発成分分析を行った。pH はガラス電極により測定した。日清カメリヤ強力粉 10.0 g 及びレーズン発酵液 6.0 mL を手で 1 分間素早く混捏し、30°C で 5 時間発酵して生地から発生するガスをパン生地発酵力として測定し、パン生地発酵力が最大となるレーズン濃度と発酵日数を至適発酵条件と決定した。なお、調製したレーズン発酵液は全量を各種分析もしくは製パン試験に消費した。

(4) 製パン試験

ホームベーカリー (SD-BMT1000; パナソニック株式会社) を使用して、

天然酵母モード（所要時間約 7 時間）により製パンした。生地は強力小麦粉（カメリヤ；日清フーズ株式会社）300 g，無塩バター（よつ葉乳業株式会社）10.0 g，食塩 5.0 g，レーズン発酵液 100 mL，蒸留水 90 mL とした。パンの比容積（mL/g）は，室温まで冷却した後，重量と菜種置換法による体積から算出した。また，第 II 章と同様に 3 名のパネルで簡易的に官能評価を行い，パンの外観（クラスト）の色，内層（クラム）の色，味，香りについて感じられた特徴を記述した。

（5）各種成分分析

第 II 章と同様に，可溶性成分である糖，有機酸，遊離アミノ酸は液体高速クロマトグラフィーによって，揮発成分は SPME を使用してガスクロマトグラフ質量分析計によって分析した。

（6）統計解析

すべての実験は独立して 3 回実施し，得られたデータは平均値±標準偏差で表した。また得られたデータは *Student* の t 検定により有意差を検定

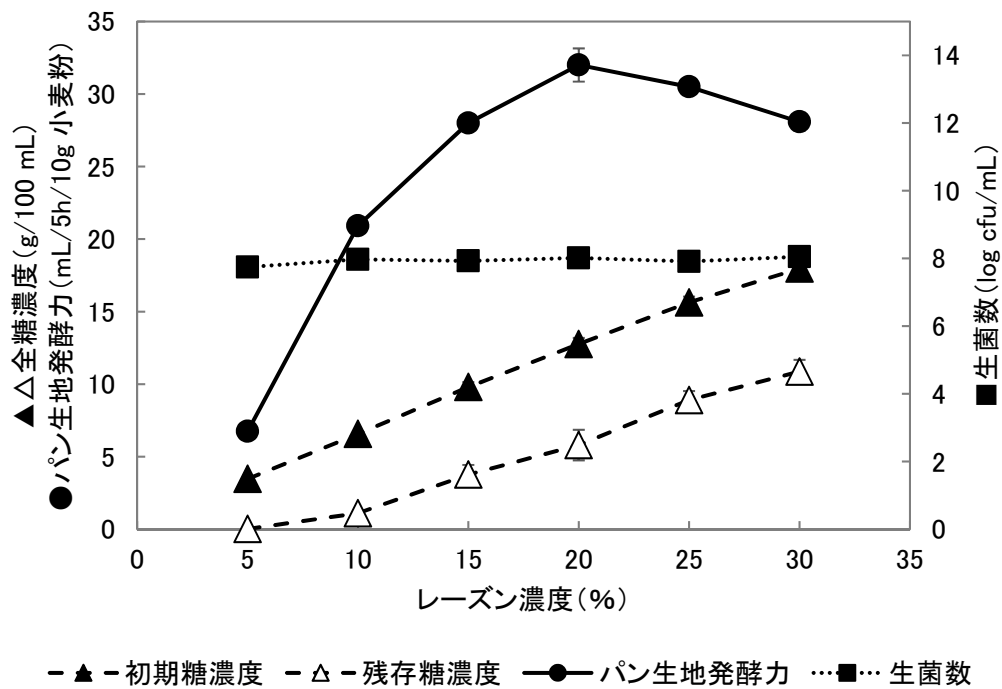
した。

3. 実験結果

(1) レーズン発酵液の至適発酵条件

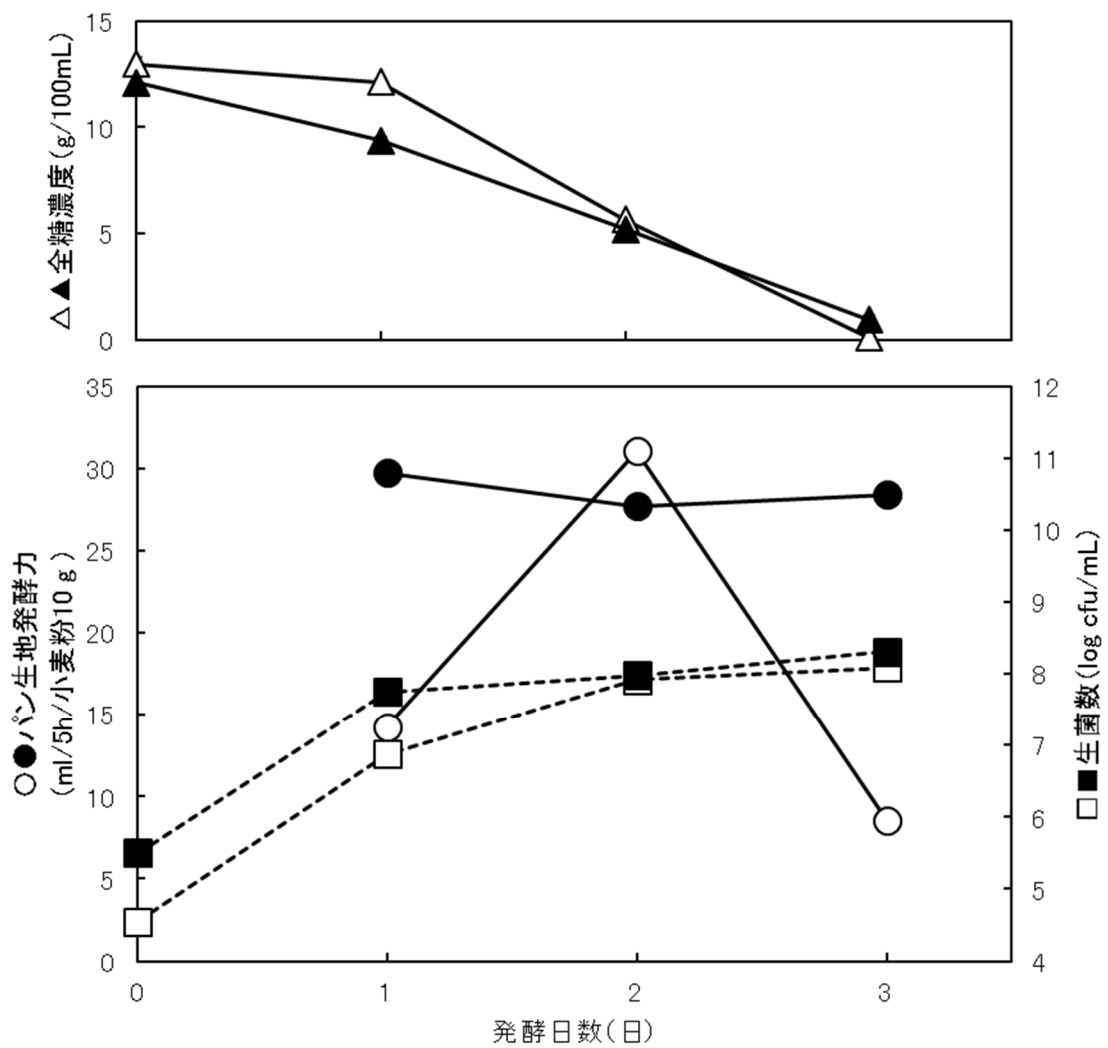
レーズン濃度 5~30%の抽出液を調製し、これらの抽出液に種培養液を接種して 25℃で 2 日間静置して発酵した後、パン生地発酵力と生菌数を測定した(図Ⅲ-1)。パン生地の発酵力はレーズン濃度の増加とともに増加し、レーズン濃度 20%が最大となった。生菌数はレーズン濃度に依存せずほぼ一定であった。

TW15 のパン生地発酵力が最大となったレーズン濃度 20%の抽出物の発酵経過を HP467 と比較した(図Ⅲ-2)。TW15 の生菌数は発酵開始 1 日目まで急激に増加した後もわずかに増加し、その一方で全糖濃度は減少した。TW15 はレーズン抽出物を 3 日発酵するとパン生地発酵力が低下した。したがって、パン生地発酵力が最大となったレーズン濃度 20%、発酵 2 日を TW15 のレーズン抽出液の至適発酵条件とした。



図III-1. TW15 を発酵に用いたレーズン発酵液中のレーズン濃度とパン生地発酵力の関係性

各濃度のレーズン発酵液を 25 °C, 2 日発酵した。それぞれの記号はグルコースとフルクトースの合計である全糖を▲もしくは△, パン生地発酵力を●, 生菌数を■で表した。なお, ▲は発酵前の全糖濃度, △は発酵後の全糖濃度を表している。



図Ⅲ-2. TW15 と HP467 のレーズン濃度 20%の発酵液のパン生地発酵力の推移
 それぞれの記号はパン生地発酵力を○もしくは●，生菌数を□もしくは■，全糖を△
 もしくは▲で表した。白抜きの記号は TW15，塗りつぶしの記号は HP467 を示して
 いる。

(2) レーズン発酵液の評価

TW15 もしくは HP467 によって調製したレーズン濃度 20%、発酵 2 日目の 2 つの抽出液のパン生地発酵力、生菌数、フルクトースとグルコースの量、pH を比較した (表 III-1)。TW15 は HP467 の生菌数と残存糖の量は同等であったが、有意に高いパン生地発酵力を示した。これは第 II 章と同様の結果であった。

TW15 を発酵に用いた発酵液の揮発成分は、HP467 の発酵液と比較して大きな違いが得られた (表 III-2)。特に違いが大きかった酢酸 2-フェニルエチルはおよそ 22 倍であった。このほかにも TW15 に特異的な化合物として、第 II 章で TW15 を発酵に用いたパンの特徴的な揮発成分のひとつであったアセトイン、さらにはゲラニオールやリナロールといったモノテルペン系化合物も検出した。

表Ⅲ-1. レーズン濃度 20%, 2 日発酵したレーズン抽出液の比較

	TW15	HP467
パン生地発酵力 (mL/5h/10 g 小麦粉)	31.1 ± 0.5**	27.8 ± 0.4
生菌数 (log cfu/mL)	7.92 ± 0.05	7.99 ± 0.06
全糖 (g/100mL)	5.67 ± 0.06	5.20 ± 0.30
pH	3.55 ± 0.04	3.67 ± 0.03*

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

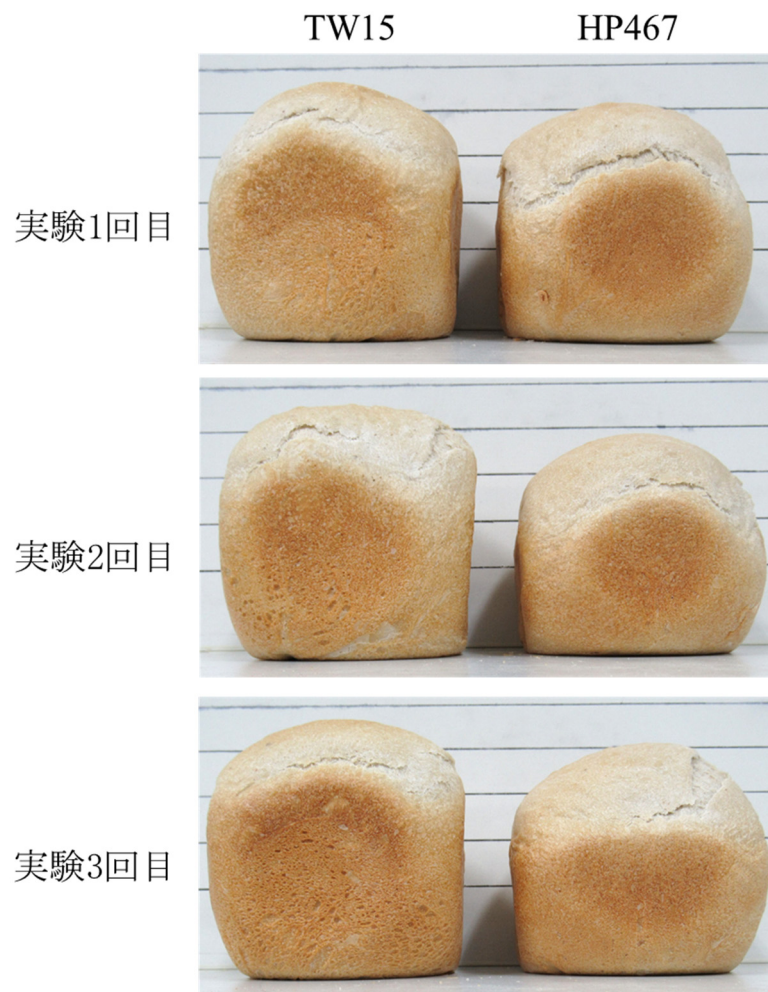
表Ⅲ-2. TW15 と HP467 を発酵に用いたレーズン発酵液の揮発成分

化合物	相対面積 (%)		面積比 (TW15/HP467)	P値
	TW15	HP467		
アセトイン	0.555 ± 0.084	0.000 ± 0.000	-	**
イソアミルアルコール	5.673 ± 0.538	10.231 ± 0.560	0.55	*
カプリル酸	0.000 ± 0.000	0.175 ± 0.023	0.00	**
カプリル酸イソアミル	0.042 ± 0.037	0.171 ± 0.272	0.24	
カプリル酸エチル	0.145 ± 0.034	2.562 ± 0.227	0.06	**
カプリン酸	0.474 ± 0.168	0.058 ± 0.002	8.16	
カプリン酸イソアミル	0.000 ± 0.000	0.122 ± 0.019	0.00	**
カプリン酸エチル	1.372 ± 0.304	1.599 ± 0.112	0.86	
カプロン酸	0.000 ± 0.000	0.099 ± 0.011	0.00	**
カプロン酸エチル	0.004 ± 0.004	0.403 ± 0.016	0.01	**
吉草酸	0.000 ± 0.000	0.009 ± 0.000	0.00	**
ゲラニオール	0.018 ± 0.003	0.000 ± 0.000	-	**
酢酸2-フェニルエチル	12.644 ± 0.464	0.567 ± 0.205	22.28	**
1-ノナノール	0.030 ± 0.008	0.010 ± 0.000	2.99	
ノナン酸	0.016 ± 0.005	0.000 ± 0.000	-	**
3-フェニルプロパン酸	0.005 ± 0.002	0.000 ± 0.000	-	**
2-フェネチルアルコール	4.970 ± 0.241	8.705 ± 0.669	0.57	**
プロピオン酸フェニルエチル	0.081 ± 0.011	0.000 ± 0.000	-	**
1-ヘキサノール	0.072 ± 0.012	0.047 ± 0.001	1.53	*
ベンジルアルコール	0.010 ± 0.000	0.018 ± 0.005	0.57	*
ベンズアルデヒド	0.218 ± 0.027	0.125 ± 0.024	1.75	*
3-メチルチオプロパノール	0.014 ± 0.007	0.145 ± 0.029	0.09	**
2-メチル酪酸	0.018 ± 0.008	0.000 ± 0.000	-	*
リナロール	0.006 ± 0.001	0.000 ± 0.000	-	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

(3) パンの品質評価

TW15 のパン生地発酵力が最大になったレーズン濃度 20%で 2 日発酵したレーズン発酵液を使用して製パンをした (図III-3)。 TW15 を発酵に用いたパンの比容積 2.85 ± 0.05 mL/g は、HP467 を発酵に用いたパンの比容積 2.48 ± 0.03 mL/g よりも有意に大きかった。簡易的な官能評価により、3 名のパネルすべてが、華やかな香りについて HP467 よりも TW15 のパンを評価した。パンの揮発成分中の主要な成分 (相対面積 > 1.0%) は、アセトイン、イソアミルアルコール及び 2-フェネチルアルコールであった (表 III-2)。可溶性成分のうち、総遊離アミノ酸は TW15 が低く、有機酸の一種である酢酸は TW15 を発酵に用いたパンの含有量が有意に高かったが、大きな数値の差異ではなかったため、官能的に差異は見いだせないと考えられた。また、パンの残存糖は TW15 と HP467 に有意な違いはなかった (表 III-3)。



図Ⅲ-3. TW15 と HP467 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用したパンの外観
独立して3回実施した実験結果を上から順に表した。

表Ⅲ-3. TW15 と HP467 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用したパンクラムの揮
発成分

化合物	相対面積(%)		面積比 (TW15/HP467)	P値
	TW15	HP467		
アセトイン	4.619 ± 0.560	1.294 ± 0.143	3.57	**
イソアミルアルコール	7.012 ± 0.873	12.908 ± 1.290	0.54	**
吉草酸	0.027 ± 0.008	0.017 ± 0.006	1.64	**
カブリン酸エチル	0.040 ± 0.010	0.055 ± 0.007	0.73	**
カブロン酸エチル	0.095 ± 0.018	0.118 ± 0.024	0.81	*
酢酸2-フェニルエチル	0.253 ± 0.132	0.000 ± 0.000	-	**
2-フェネチルアルコール	3.068 ± 1.088	3.953 ± 0.450	0.78	*
フルフリルアルコール	0.057 ± 0.066	0.046 ± 0.076	1.24	
1-ヘキサノール	0.732 ± 0.056	0.617 ± 0.025	1.19	**
1-ヘプタノール	0.070 ± 0.026	0.000 ± 0.000	-	**
ベンジルアルコール	0.017 ± 0.006	0.010 ± 0.004	1.68	*
ベンズアルデヒド	0.675 ± 0.063	0.264 ± 0.025	2.56	**
2-ペンチルフラン	0.271 ± 0.066	0.221 ± 0.095	1.23	
3-メチルチオプロパノール	0.000 ± 0.000	0.027 ± 0.005	0.00	**
2-メチル-1-ヘキサノール	0.059 ± 0.045	0.000 ± 0.000	-	**
2-メチル-3-ヘキサノール	0.057 ± 0.013	0.000 ± 0.000	-	**
2-メチルペンタン	0.046 ± 0.015	0.000 ± 0.000	-	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表Ⅲ-3. TW15 と HP467 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用したパンの
可溶性成分

化合物	含有量 (mg/乾物 100 g)		P値
	TW15	HP467	
総遊離アミノ酸	111 ± 9	147 ± 15	**
有機酸			
酢酸	55 ± 2	34 ± 2	**
コハク酸	9 ± 3	19 ± 2	**
糖			
フルクトース	911 ± 433	1,143 ± 85	
グルコース	342 ± 256	305 ± 75	
マルトース	5,490 ± 591	5,450 ± 752	
スクロース	171 ± 1	172 ± 0	

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

4. 考察

TW15 と HP467 を発酵に用いたレーズン発酵液を調製して製パンへの応用を検討した。それぞれのレーズン抽出液の発酵経過は生菌数、残存糖ともに類似した傾向であったが、レーズン抽出液発酵 3 日後のパン生地発酵力は TW15 が低下し、HP467 が低下しなかった (図III-2)。この TW15 のパン生地発酵力の低下は、レーズン発酵液から生地には供給される発酵性糖が不足したためと考えられ、もう一方の HP467 は小麦粉に由来するマルトースなどを発酵したことにより低下が抑制されたものと考えられた。

至適発酵条件によって調製したレーズン発酵液を使用した TW15 を発酵に用いたパンの比容積は 2.85 ± 0.05 mL/g, HP467 は 2.48 ± 0.03 mL/g であり, HP467 よりも膨らみの良いパンが得られた (図III-3)。しかしながら, 第 I 章のように培養菌体を使用した製パンにより得られるパンの比容積 (TW15 は 4.62 ± 0.03 mL/g, HP467 は 4.35 ± 0.02 mL/g) と比較すると十分な比容積ではなかった。レーズン発酵液による製パンでは小麦粉に由来する主要な糖であるマルトースやその他の糖も残存しているため, 市販パン酵母を製パン時に併用することで比容積を改善することが可能と考え

られた。

レーズン発酵液中の揮発成分では、TW15 株による発酵液は HP467 株による発酵液のおよそ 22 倍に相当する非常に大量の酢酸 2-フェニルエチルを含んでいた (表III-2)。ベンゼノイド化合物の優先的合成は *H. vineae* に見られる特徴であり^{42,48)}、大量の酢酸 2-フェニルエチルが TW15 の発酵液に好ましい華やかな香りを付与したものと考えられた⁴⁹⁾。焼成したパンの酢酸 2-フェニルエチルの量の差は、発酵液の量の差よりも小さかった (表III-2, 3)。これは焼成により蒸発したと考えられるが、簡易的な官能評価により TW15 は華やかな香りが評価されたことから TW15 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用したパンの重要な化合物の 1 つである可能性が示唆された。また、TW15 の発酵液のみ検出されたゲラニオールとリナロールは、TW15 株から合成された β -グルコシダーゼと β -キシロシダーゼの作用により、レーズン組織のグリコシドから形成された可能性が考えられた⁵⁰⁾。

パンクロムの主要な揮発成分であったアセトインの面積は TW15 が高く、イソアミルアルコールの面積は HP467 が高かった。イソアミルアルコール

はロイシンを出発物質として合成される。また、ロイシンに分岐鎖アミノトランスフェラーゼや分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素などが作用することでアセチル CoA が合成される⁵¹⁾。アセチル CoA はアセトアルデヒドと反応してジアセチル、そしてアセトインを合成することが可能である⁴⁵⁾。したがって、TW15 は HP467 よりもロイシンからアセトインを合成したため、イソアミルアルコールの量が少なくなったことが考えられた。

本章では異性化糖を使用せずに TW15 を製パンに応用するため、ベーカリーで一般的なレーズン種の製法を応用して、レーズン抽出液を発酵した製パン法を検討した。TW15 は市販パン酵母よりも好ましい花の香りを持つ酢酸 2-フェニルエチルを大量に発酵液中で合成し、さらに市販パン酵母よりも華やかな香りをもった比容積の高いパンが得られた。この TW15 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用する製パン法は、発酵の基質として異性化糖などの単糖を補充することなく、小規模ベーカリーでも容易に実施可能な方法であると考えられた。

IV. 製パン用酵母 *S. cerevisiae* を併用した *H. vineae* の製パン法の開発に関する研究

1. 緒言

H. vineae TW15 はパンに乳製品様と華やかな香りを与えるが、スクロースを発酵することができないため異性化糖などを製パンに利用するか、レーズン種などの発酵種を製パンに利用する必要があった。第III章の製パン試験の結果は TW15 を発酵に用いたレーズン発酵液を使用したパンの比容積は市販パン酵母菌株よりも優れていたが、市販パン酵母を製パンに併用することで比容積がさらに向上する可能性を示唆した。

製パン用酵母をはじめとする *S. cerevisiae* は細胞外にスクロースをフルクトースとグルコースに加水分解する酵素インベルターゼを分泌する⁵²⁾。したがって、TW15 は *S. cerevisiae* の存在下においてスクロースから加水分解された単糖を利用できる可能性がある。つまり、TW15 は製パン用酵母 *S. cerevisiae* を製パンに併用することによって、異性化糖ではなく一般的に製パンに使用されるショ糖を配合したパン生地を発酵し、焼きあがったパンに TW15 特有の風味を与えることが期待できる。一方で、ベーカリ

ーが最も簡便に利用できる酵母菌体は市販されている圧搾酵母もしくはドライイーストの形態であり、一般的に酵母菌体を製造するためにはスクロースを主要な糖とする糖蜜により培養されるため、スクロースにより増殖することができない TW15 は工業的に菌体を製造することが非常に困難であった。しかし、*S. cerevisiae* の共存下で TW15 を培養することによって *S. cerevisiae* の分泌するインベルターゼの働きによって TW15 の増殖が可能になることが期待できる。

既存の類似技術として中富ら⁵³⁾は腸内でのビフィズス菌など有用微生物の生育促進作用を持つフラクトオリゴ糖をパンに含有するため、スクロース非発酵性 *S. cerevisiae* 菌株と製パン用 *S. cerevisiae* を混合培養する培養法を開発した。この培養法は糖蜜によりスクロース非発酵性酵母を培養することを可能にしたが、回収した培養菌体はインベルターゼ活性が著しく低いためにフラクトオリゴ糖やスクロースをほとんど分解しなかった。したがって、この発明による培養菌体はスクロースを発酵してパン生地を膨張することができないと推察された。

本研究では、TW15 菌体の工業生産とその菌体によるスクロース配合パ

ン生地の発酵を可能とするため、まず TW15 と製パン用酵母 *S. cerevisiae* を個々に培養して回収した菌体を製パン時に混合して使用することでスクロースを配合したパン生地の発酵が可能か検証し、つづいてスクロースを糖源とした培地で製パン用酵母 *S. cerevisiae* と混合培養し、回収した混合培養菌体を使用してスクロースを配合した製パン試験を実施して TW15 特有の風味を再現したパンが得られる菌体の培養条件を検討した。

2. 実験材料及び方法

(1) 使用菌株

ワイン用ブドウ「山幸」から分離した *H. vineae* TW15 と 高いインベルターゼ活性を持つ製パン用酵母 *S. cerevisiae* NBRC2044 を使用した。

(2) 培養

TW15 及び NBRC2044 は、第 II 章の方法と同一の方法で培養した。遠心分離により培養菌体を回収し、蒸留水で菌体を洗浄した後、蒸留水で再懸濁して各酵母の懸濁液の一部である 1.0 mL をマイクロチューブに移し、

80 °Cで3時間加熱して乾燥して固形分を測定した。残りの菌体懸濁液はさまざまな比率で混合し、液体発酵力測定試験及びインペルターゼ活性測定試験に使用した。製パン試験に使用する菌体は第II章と同じく、遠心分離により回収した菌体を洗浄した後、乾燥した吸収板で脱水したものを使用した。

混合培養は上記と同様に種培養した培養液を TW15:NBRC 2044 =99.9:0.1, 99:1, 90:10, 0:100 の比率で混合した菌液 1.0 mL を 1.0% バクト酵母エキス, 2.0% バクトペプトン, 2.0% スクロース, 0.2% リン酸二水素カリウム, 0.1% 硫酸マグネシウム七水和物, 及び 0.05% アデカノール LG-294 から成る培地 100 mL に接種し, 30 °C, 24 時間, 150 rpm の振盪培養をした。上記と同様に菌体を回収して各種試験に使用した。

(3) 混合培養菌体の評価

TW15 と NBRC2044 のそれぞれの菌数は、細胞形態による顕微鏡観察、また PDA 培地と *S. cerevisiae* 存在下でも *H. vineae* 特異的に検出可能なリジン基礎培地によるコロニー計測の2つの識別法で決定した⁵⁴⁾。

培養した酵母菌体の懸濁液を乾物 200 mg/5 mL に調製して第 II 章と同一の方法で液体発酵力を測定した。インベルターゼ活性の測定は液体発酵力試験に使用した菌体懸濁液と同一のものを酵素液として使用した。100 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) に 187.5 mM スクロースを含む基質溶液を 0.20 mL ずつ試験管に分注し、あらかじめ 30 °C に保温しておいた菌体懸濁液を 0.5 mL 加えて 30 °C でインキュベートした。3 分後に DNS 試薬 (1.0% 3,5-ジニトロサリチル, 1.7% 水酸化ナトリウム, 30% 酒石酸ナトリウムカリウム) 0.25 mL を添加して反応を停止し、沸騰水中で 5 分間加熱して発色させて氷水で急冷し、蒸留水 5.0 mL を添加して OD535 nm を測定した。標準曲線はグルコースで作成し、乾燥菌体重量 1 mg の酵母菌体が 1 nmol の転化糖を生成する活性を 1 単位とした。

(4) 製パン試験

回収した培養菌体は細胞数を揃えるため第 II 章と同様に固形分 33% (w/w) に換算して配合量を調整した。製パンは強力小麦粉 (カメリヤ; 日清フーズ株式会社) 250 g, 無塩バター (よつ葉乳業株式会社) 10.0 g, シ

ヨ糖（日本甜菜製糖株式会社）17.0 g, スキムミルク（雪印メグミルク株式会社）6.0 g, 食塩 5.0 g, 酵母培養菌体 7.0 g（固形分 33%換算）, 蒸留水 170 mL をホームベーカリー（SD-BMT1000; パナソニック株式会社）に投入した。TW15 と NBRC2044 を個々に培養して回収した菌体を混合して使用した製パン試験では早焼き食パンモード（所要時間約 2 時間）の設定を使用し, TW15 と NBRC2044 の混合培養菌体を使用した製パン試験では標準的な食パンモード（所要時間約 4 時間）の設定を使用した。また, 第 II 章と同様に, 3 名のパネルで簡易的に官能評価を行い, パンの外観（クラスト）の色, 内層（クラム）の色, 味, 香りについて感じられた特徴を記述した。

(5) 各種成分分析

第 II 章と同様に, 可溶性成分である糖, 有機酸, 遊離アミノ酸は液体高速クロマトグラフィーによって, 揮発成分は SPME を使用してガスクロマトグラフ質量分析計によって分析した。

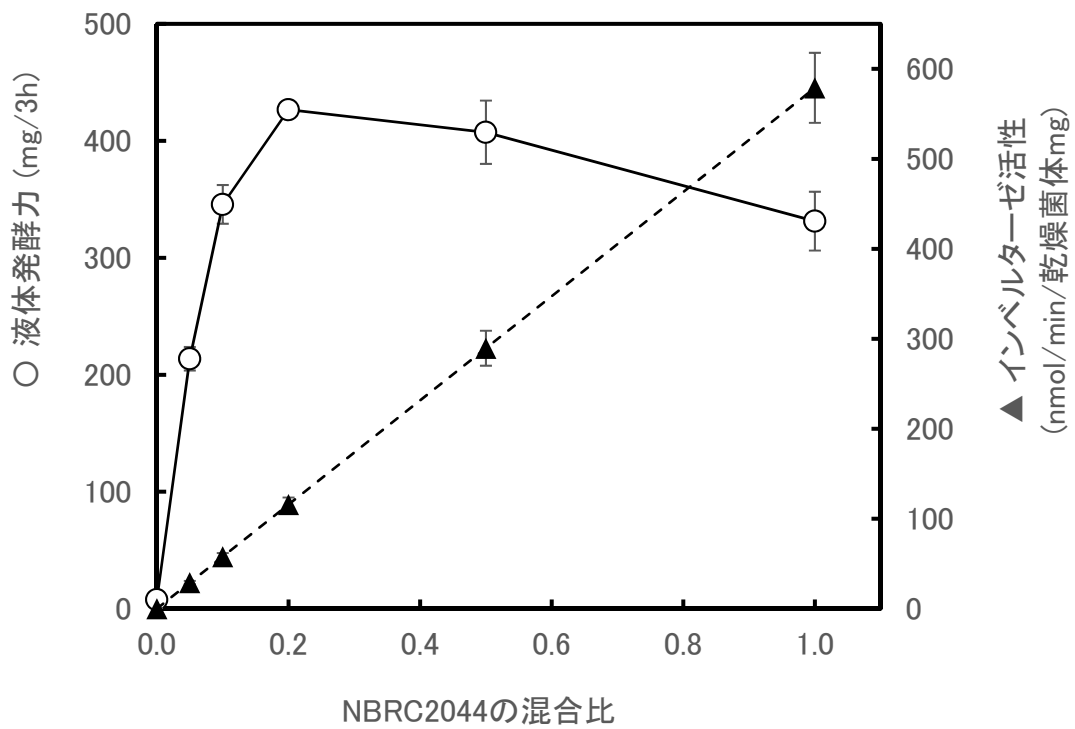
(6) 再現性

すべての実験は独立して 3 回以上実施し、得られたデータは平均値±標準偏差として表した。有意差は一元配置分散分析と Tukey の多重比較検定により検定した。

3. 実験結果

(1) インベルターゼ活性の影響

NBRC2044 と TW15 をグルコースで個々に培養し、菌体をさまざまな比率で混合してスクロースの発酵能力を評価した (図IV-1)。TW15 単独を意味する混合比 0.0 ではインベルターゼ活性が検出できないほど非常に低く、スクロースを発酵することができなかった。NBRC2044 との混合比 0.2 でスクロース発酵能力が最大に達し、このときのインベルターゼ活性は 116 nmol / min / 乾燥菌体 mg であった。TW15 の存在比率が下がる混合比 0.5 と 1.0 ではインベルターゼ活性は増加するものの、スクロース用いた液体発酵力は低下した。



図IV-1. インペルターゼ活性と液体発酵力の関係性

(2) 培養菌体を混合使用したパンの評価

TW15 と NBRC2044 それぞれグルコースを糖源とした培地で個々に培養した菌体を使用して、4つの混合比 TW15 : NBRC2044 = 90 : 10, 80 : 20, 50 : 50, 0 : 100 で製パンをした。混合比 TW15 : NBRC2044 = 90 : 10 のパンの比容積は他のものよりも低かったが、その他の間に有意差はなかった (図IV-2)。3名のパネルによるそれぞれのパンの簡易的な官能評価のコメントは次の通りであった。90 : 10 はわずかに酒粕様の香りが感じられた。80 : 20 は TW15 特有の増強された乳製品の香りと華やかな香り、さらに甘い香りも感じられた。50 : 50 はわずかに膨らみが良いが、TW15 特有の香りと味の特徴が弱まっており、少し物足りない風味に感じられた。0 : 100 は焼き色が濃く、味と香りが物足りなく感じられた。

官能的な違いの原因を調べるために、パンクラムの各種成分を分析した。TW15 を発酵に用いたパンの特徴的な揮発性化合物であるアセトインの相対面積は混合比 80 : 20 が最も高く、酢酸 2-フェニルエチルの相対面積は、混合比 90 : 10 と 80 : 20 が最も高かった (表IV-1)。可溶性成分の総遊離アミノ酸は NBRC2044 の比率が高まるにつれて減少し、有機酸は増加した

(表IV-2)。また、糖は NBRC2044 の比率が高まるにつれてスクロースは減少し、フルクトースとグルコースの残存量が増加した。

実験1回目



実験2回目



実験3回目



実験4回目



TW15 : NBRC2044 混合比率	90:10	80:20	50:50	0:100
比容積 (mL/g)	3.17 ± 0.09 ^b	3.60 ± 0.02 ^a	3.82 ± 0.07 ^a	3.78 ± 0.14 ^a

図IV-2. TW15 と NBRC2044 を混合使用したパンの外観と比容積

独立して4回実施した実験結果を上から順に表した。

表IV-1. TW15 と NBRC2044 を混合使用したパンの揮発成分

化合物	相対面積 (%)			
	TW15 : NBRC 2044の混合比			
	90 : 10	80 : 20	50 : 50	0 : 100
アセトイン	2.725 ± 0.633 ^b	4.329 ± 0.516 ^a	2.874 ± 1.198 ^b	1.915 ± 0.961 ^b
イソアミルアルコール	8.905 ± 0.913 ^a	6.933 ± 0.699 ^b	6.619 ± 0.584 ^b	7.255 ± 0.818 ^b
イソ吉草酸	0.146 ± 0.082 ^b	0.165 ± 0.040 ^b	0.225 ± 0.063 ^b	0.760 ± 0.274 ^a
イソ酪酸	0.093 ± 0.013 ^b	0.074 ± 0.032 ^b	0.103 ± 0.022 ^b	0.196 ± 0.040 ^a
カブロン酸	0.178 ± 0.077	0.140 ± 0.039	0.140 ± 0.054	0.165 ± 0.073
吉草酸	0.024 ± 0.006	0.026 ± 0.007	0.024 ± 0.014	0.041 ± 0.030
酢酸	0.490 ± 0.071 ^b	0.589 ± 0.163 ^b	0.652 ± 0.151 ^b	0.854 ± 0.160 ^a
酢酸2-フェニルエチル	0.402 ± 0.033 ^a	0.396 ± 0.028 ^a	0.269 ± 0.024 ^b	0.071 ± 0.011 ^c
ジアセチル	0.052 ± 0.039 ^a	0.054 ± 0.019 ^a	0.032 ± 0.025 ^{ab}	0.017 ± 0.006 ^b
ドデカン	0.185 ± 0.069	0.132 ± 0.015	0.133 ± 0.013	0.191 ± 0.075
フルフラール	0.029 ± 0.015	0.021 ± 0.010	0.042 ± 0.023	0.061 ± 0.059
2-フェネチルアルコール	2.052 ± 0.214 ^c	2.304 ± 0.176 ^c	2.775 ± 0.256 ^b	3.073 ± 0.183 ^a
ヘキサノール	0.596 ± 0.065 ^a	0.472 ± 0.093 ^b	0.400 ± 0.029 ^b	0.435 ± 0.102 ^b
ベンズアルデヒド	0.199 ± 0.028 ^b	0.250 ± 0.040 ^b	0.387 ± 0.088 ^{ab}	0.379 ± 0.081 ^a
2-ペンチルフラン	0.224 ± 0.023 ^a	0.185 ± 0.021 ^{bc}	0.172 ± 0.013 ^c	0.198 ± 0.021 ^b
酪酸イソアミル	0.083 ± 0.008	0.078 ± 0.018	0.071 ± 0.005	0.070 ± 0.021

各行の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

表IV-2. TW15 と NBRC2044 を混合使用したパンの可溶性成分

化合物	含有量 (mg/乾物 100 g)			
	TW15 : NBRC 2044 の混合比			
	90 : 10	80 : 20	50 : 50	0 : 100
総遊離アミノ酸	245 ± 11 ^a	211 ± 12 ^b	160 ± 6 ^c	116 ± 6 ^d
有機酸				
酢酸	53 ± 2 ^c	80 ± 12 ^b	95 ± 18 ^a	105 ± 7 ^a
コハク酸	17 ± 2 ^c	17 ± 2 ^c	27 ± 4 ^{ab}	23 ± 6 ^b
糖				
フルクトース	302 ± 90 ^d	553 ± 166 ^c	2,067 ± 216 ^b	3,059 ± 85 ^a
グルコース	182 ± 3 ^d	307 ± 95 ^c	921 ± 160 ^b	1,673 ± 61 ^a
ラクトース	1,272 ± 20 ^b	1,285 ± 28 ^{ab}	1,330 ± 77 ^a	1,285 ± 11 ^b
マルトース	2,928 ± 138 ^{ab}	2,897 ± 85 ^b	3,050 ± 86 ^a	3,059 ± 92 ^a
スクロース	5,087 ± 226 ^a	3,629 ± 227 ^b	1,208 ± 349 ^c	123 ± 92 ^d

各行の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

(3) 混合培養法の評価

TW15 と NBRC2044 それぞれの種培養液を TW15 : NBRC2044 = 99.9 : 0.1, 99 : 1, 90 : 10, 0 : 100 の 4 つの異なる比率で接種し、スクロースを糖源とした培地で混合培養した (表IV-3)。その結果、菌体収量はインベルターゼ活性と同様に NBRC2044 の割合に比例して増加した。インベルターゼ活性は接種比 99.9 : 0.1 が 111 ± 51 nmol / min / 乾燥菌体 mg, 99 : 1 が 206 ± 70 nmol / min / 乾燥菌体 mg, 90 : 10 が $1,120 \pm 156$ nmol / min / 乾燥菌体 mg, 0 : 100 が $2,140 \pm 195$ nmol / min / 乾燥菌体 mg であった。リジン基礎培地と顕微鏡観察による分析により、混合培養後の TW15 の割合は接種比 99.9 : 0.1 が約 96%, 99 : 1 が 92%, 90 : 10 が 80%, 0 : 100 が 0% であった。なお、リジン基礎培地による TW15 の割合は、TW15 と NBRC2044 それぞれの生菌数から算出した結果であり、顕微鏡観察による TW15 の割合はそれぞれの生菌、死菌問わず算出した結果である。

表IV-3. TW15 と NBRC2044 の混合培養菌体の評価

	TW15 : NBRC 2044の接種比			
	99.9 : 0.1	99 : 1	90 : 10	0 : 100
菌体収量 (乾燥菌体mg/100 mL)	4.9 ± 0.4 ^c	5.3 ± 0.2 ^{bc}	5.7 ± 0.1 ^{ab}	6.1 ± 0.1 ^a
インペルターゼ活性 (nmol/min/乾燥菌体mg)	111 ± 51 ^c	206 ± 70 ^c	1,120 ± 156 ^b	2,140 ± 195 ^a
判定法	TW15の存在割合 (%)			
顕微鏡観察	96.9 ± 0.1 ^a	92.2 ± 0.4 ^b	79.5 ± 0.1 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
リジン基礎培地	96.3 ± 2.5 ^a	91.7 ± 3.3 ^{ab}	85.8 ± 6.5 ^b	0.0 ± 0.0 ^c

各行の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

(4) 混合培養菌体を使用したパンの品質評価

TW15 と NBRC2044 の混合培養により回収した菌体を使用して製パン試験を実施した。比容積は接種比 TW15 : NBRC2044 = 99.9 : 0.1 が 3.91 ± 0.14 mL/g, 99 : 1 が 3.98 ± 0.15 mL/g, 90 : 10 が 4.69 ± 0.07 mL/g, 0 : 100 が 4.62 ± 0.18 mL/g であった (図IV-3)。簡易的に官能評価をしたところ、接種比 99.9 : 0.1 と 99 : 1 のパンに先述の混合比 80 : 20 と同様な TW15 特有の風味が感じられた。パンクラムの総遊離アミノ酸は接種比率 99 : 1 が最も高く、酢酸は NBRC2044 の比率が高まるにつれて減少した (表IV-4)。接種比率 99.9 : 0.1 と 99 : 1 はスクロースが残存していたが、90 : 10 と 0 : 100 はスクロースをすべて消費してフルクトースが残存していた (表IV-4)。第II章で推察された TW15 特有の香りに寄与している揮発成分のアセトインは接種比率 99.9 : 0.1 と 99 : 1 の相対面積が有意に高く、酢酸は 99.9 : 0.1, 99:1, 90 : 10 が有意に高く、酢酸 2-フェニルエチルは 99.9 : 0.1, 99:1, 90 : 10 が有意に高かった (表IV-5)。

実験1回目



実験2回目



実験3回目



TW15:NBRC 2044 接種比	99.9:0.1	99 : 1	90 : 10	0:100
比容積 (mL/g)	3.91 ± 0.14^b	3.98 ± 0.15^b	4.69 ± 0.07^a	4.62 ± 0.18^a

図IV-3. TW15 と NBRC2044 の混合培養菌体を使用したパンの外観と比容積
独立して3回実施した実験結果を上から順に表した。

表IV-4. TW15 と NBRC2044 の混合培養菌体を使用したパンの可溶性成分

化合物	含有量 (mg/乾物 100 g)			
	TW15 : NBRC 2044 の接種比			
	99.9 : 0.1	99 : 1	90 : 10	0 : 100
総遊離アミノ酸	133.2 ± 6.6 ^b	164.3 ± 14.6 ^a	97.4 ± 9.6 ^c	90.0 ± 3.4 ^c
有機酸				
酢酸	186 ± 15 ^a	176 ± 26 ^a	161 ± 14 ^a	121 ± 20 ^b
コハク酸	17 ± 2 ^b	15 ± 4 ^b	18 ± 5 ^b	61 ± 13 ^a
糖				
フルクトース	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	330 ± 496 ^b	1,436 ± 295 ^a
グルコース	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
ラクトース	1,150 ± 76	1,229 ± 162	1,112 ± 116	1,098 ± 56
マルトース	2,657 ± 416	2,777 ± 235	2,805 ± 228	2,426 ± 361
スクロース	1,850 ± 340 ^a	1,715 ± 287 ^a	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b

各行の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

表IV-5. TW15 と NBRC2044 の混合培養菌体を使用したパンの揮発成分

化合物	相対面積 (%)			
	TW15 : NBRC 2044の接種比			
	99.9 : 0.1	99 : 1	90 : 10	0 : 100
アセトイン	3.919 ± 0.568 ^a	3.950 ± 0.707 ^a	2.068 ± 0.835 ^b	0.686 ± 0.227 ^c
イソアミルアルコール	3.672 ± 0.870	3.856 ± 0.677	3.192 ± 1.104	3.771 ± 0.927
イソ吉草酸	0.115 ± 0.037 ^c	0.103 ± 0.033 ^c	0.376 ± 0.075 ^b	0.461 ± 0.063 ^a
イソ酪酸	0.053 ± 0.010 ^c	0.050 ± 0.008 ^c	0.105 ± 0.015 ^b	0.156 ± 0.020 ^a
カプロン酸	0.308 ± 0.165	0.267 ± 0.110	0.213 ± 0.073	0.266 ± 0.112
吉草酸	0.063 ± 0.019	0.056 ± 0.016	0.056 ± 0.012	0.051 ± 0.009
酢酸	1.790 ± 0.494 ^a	1.770 ± 0.337 ^a	1.797 ± 0.275 ^a	0.957 ± 0.392 ^b
酢酸2-フェニルエチル	0.758 ± 0.128 ^a	0.696 ± 0.099 ^a	0.746 ± 0.300 ^a	0.117 ± 0.037 ^b
ジアセチル	0.051 ± 0.017 ^a	0.050 ± 0.000 ^a	0.030 ± 0.012 ^b	0.011 ± 0.004 ^c
ドデカン	0.144 ± 0.029	0.144 ± 0.025	0.127 ± 0.036	0.124 ± 0.022
フルフラール	0.023 ± 0.029	0.021 ± 0.020	0.051 ± 0.056	0.028 ± 0.030
2-フェネチルアルコール	2.845 ± 0.501 ^c	2.328 ± 0.238 ^c	4.891 ± 0.388 ^b	6.944 ± 0.698 ^a
ヘキサノール	0.156 ± 0.014 ^a	0.147 ± 0.020 ^a	0.119 ± 0.024 ^b	0.075 ± 0.022 ^c
ベンズアルデヒド	0.351 ± 0.049 ^a	0.259 ± 0.034 ^b	0.282 ± 0.048 ^b	0.228 ± 0.046 ^b
2-ペンチルフラン	0.094 ± 0.009 ^a	0.087 ± 0.015 ^a	0.075 ± 0.030 ^{ab}	0.058 ± 0.019 ^b
酪酸イソアミル	0.087 ± 0.014 ^{ab}	0.096 ± 0.019 ^a	0.065 ± 0.024 ^{bc}	0.057 ± 0.018 ^c

各行の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

4. 考察

NBRC2044 と TW15 をグルコースで培養し、菌体を混合してスクロースの発酵能力を液体発酵力により評価し、NBRC2044 との混合比 0.2 でスクロース発酵能力が最大に達した（図IV-1）。この結果は異性化糖などの TW15 の発酵性糖を原料として使用しなくとも、NBRC 2044 が分泌したインベルターゼによって TW15 に十分な発酵性糖を供給できる可能性を示唆した。なお、NBRC2044 のインベルターゼ活性は以前に報告されたものよりも低かった¹⁶⁾。本研究ではグルコースで培養したが、先の報告の実験はスクロースで培養していたためインベルターゼの発現が誘導されたものと考えられた。

液体発酵力測定と同様に TW15 と NBRC2044 の培養菌体を混合して製パン試験を行った。NBRC2044 の混合比率が 20% までは混合比率の増加に伴いパンの比容積が増大したが、20% 以上になるとパンの比容積は変わらなかった（図IV-2）。つまり、混合比率 20% 以上で NBRC2044 の分泌するインベルターゼが TW15 を発酵に用いた生地 of 膨張に十分な単糖を供給したと考えられた。一方で、NBRC2044 の混合比が増加するにつれてパンク

ラムの総遊離アミノ酸の含有量が減少して有機酸の含有量が増加した（表IV-2）。総遊離アミノ酸と有機酸の含有量は、酵母細胞の代謝活性に関連しているものと思われ、NBRC2044はTW15よりも早くアミノ酸を消費して有機酸を大量に合成したと考えられた。グルコースとフルクトースの含有量が少ないということは、インベルターゼの作用によってスクロースから加水分解された単糖が混合比90：10と80：20のパンではすぐに発酵に使用されるのに対し、混合比50：50と0：100のパンでは過剰であることを意味している。還元糖はパンの焼き色を増すメイラード反応に参与するため、50：50と0：100のパンは焼き色が濃くなったものと考えられた。

混合培養菌体のインベルターゼ活性から接種比99：1でも十分に比容積の高いパンが得られると予測していたが、実際にはよりインベルターゼ活性の高かった接種比率90：10と0：100の比容積が高かった（図IV-3）。これはおそらくパン生地中のスクロースの拡散が液体培地よりも遅いため、高い比容積のパンが得られるためにはより高いインベルターゼ活性が必要であったものと考えられた。

3名のパネルによる簡易的な官能評価は、99.9：0.1及び99：1の接種比

で焼いたパンが、培養菌体を混合使用した製パン試験における混合比 80 : 20 により調製したパンと類似していると評価した。いくつかの可溶性成分の含有量に違いがあったが、接種比率 99.9 : 0.1 及び 99 : 1 によるパンは、混合比 80 : 20 で調製されたパンと同様にアセトインの相対面積が高かった。したがって、アセトインは TW15 を発酵に用いたパンの好ましい風味にとって重要な成分である可能性が高いと考えられた。

スクロース発酵能のない TW15 は、製パン用酵母 *S. cerevisiae* と混合培養することにより、ショ糖を使用するごく一般的な製パン法に適応して、好ましい品質のパンを得ることができた。本章で開発した培養方法及び製パン法は、スクロース非発酵性である *H. vineae* もスクロース存在下で培養することができ、また異性化糖を添加することなく好ましい風味のパンが得られる方法である。これまでのスクロースの発酵が不可能な状態ではベーカリーでの使用方法がかなり限定的であったが、本章の開発した手法によって *H. vineae* の製パンへの利便性が大幅に向上することが示された。

V. *Hanseniaspora vineae* を利用したワインの開発に関する研究

1. 緒言

ワイン醸造において、酵母は糖をエタノールと炭酸ガスへ変換するアルコール発酵を引き起こす特に重要な微生物である。酵母はアルコールの生成のみならず、代謝産物の生成と分泌によりワインの風味にも影響を与えることが報告されている⁵⁵⁾。近年ではアルコール発酵を主として担う *S. cerevisiae* だけでなく、ブドウの表面などに由来する *Non-Saccharomyces* 属酵母にも注目が集まっている。*Non-Saccharomyces* 属酵母はワイン醸造において自然発生的に関与し、より良い発酵を引き起こしてワインの風味の改善につながる酵母の存在が数多く報告されている⁵⁶⁾。この *Non-Saccharomyces* 属酵母である *H. vineae* は酢酸 2-フェニルエチルや酢酸エチルなどの酢酸エステルを多量に生成してフルーティーな香りのワインが得られると報告されている²³⁾。

本研究では *H. vineae* TW15 を用いた山幸ブドウのワイン醸造適性を評価することを目的に、実製造規模のワイン醸造試験を実施し、発酵過程の解析及びワインの品質評価を行った。

2. 実験材料及び方法

(1) 菌株と培養

山幸ブドウから分離した *H. vineae* TW15 は YPD 培地 10 mL に接種し、30 °C、150 rpm、24 時間種培養した後、各種試験に用いた。醸造試験は第二章と同様に培養した菌体を使用した。また、実規模スケールの試験醸造では対照区に Lallemand 社の市販乾燥ワイン酵母 *S. bayanus* DV10 を使用した。

(2) ワイン醸造適性の評価

亜硫酸耐性試験は Morata らの方法⁵⁷⁾を参考に、種培養液 100 μ L をメタ重亜硫酸カリウム濃度 0, 25, 50, 75, 100 ppm に調整した YPD 培地 (pH3.2) 10 mL に接種して 25 °C で 2 日間培養し、増殖を目視と OD600 nm の測定により評価した。

アルコール耐性試験は Ali らの方法⁵⁸⁾を参考に、種培養液を 5~14% エタノールを含む YPD 培地 (pH3.2) 10 mL に 100 μ L を接種して 25 °C で 2 日間培養し、増殖を目視と OD600 nm の測定により評価した。

(3) 試験醸造

2020年10月21日に池田町ブドウ・ブドウ酒研究所にて、前日に収穫した山幸ブドウを破碎して得られた果醪444 Lに50 ppmになるように亜硫酸カリウムを添加し、Brix23になるよう補糖し、培養菌体16 gを添加した。対照区は、同様に処理した山幸果醪410 Lに市販乾燥ワイン酵母DV10を80 g添加した。実製造条件を再現するため温度管理は実施しなかった。発酵開始12日後に圧搾して、さらに9日間発酵した後、5日間オリ下げをして瓶詰めした。搾汁率はどちらも70%程度であった。

(4) ワインの発酵経過の解析

試験醸造開始から10日目まで毎日午前9時ごろにサンプリングを実施し、12日目以降は3日に1度サンプリングを実施した。また、サンプリングはタンク内の濃度勾配や菌体の沈降の影響を除外するためにゆるやかにタンク内を攪拌してから実施し、同時に液温の計測を実施した。液温はどちらもおよそ15℃で発酵を開始し、DV10の液温は発酵開始6日目に最大の24℃となり、もう一方のTW15の液温は発酵開始8日目に最大の23℃

となった後、最終的にどちらも 7 °C まで液温が低下した。サンプリング溶液は 4 °C で保存し、サンプリング当日に次の分析に供した。

還元糖は第 II 章と同様に高速液体クロマトグラフィーにより分析した。pH はガラス電極により測定した。酵母数の計測はクロラムフェニコール添加 PDA 培地により計測し、最少セロビオース-リジン培地 (0.17% YNB without Amino Acids and Ammonium Sulfate, 0.5% セロビオース, 0.1% リジン, 2.0% 寒天) を用いたレプリカ法により *H. vineae* TW15 の菌数を計測した²³⁾。

(5) ワインの品質評価

瓶詰めしたワインは 10 °C で保管し、10 日以内に以下の分析に供した。比重、エキス分、アルコール分、総酸、還元糖、着色度は酒類総合研究所標準分析法注解に従った⁵⁹⁾。なお、着色度は光路長 5 mm のセルを用いて OD420 nm と OD530 nm における吸光度を測定した。

官能評価は池田町ブドウ・ブドウ酒研究所に所属する特に習熟したパネル 4 名を含む合計 10 名により、外観を 3 点満点、香りを 5 点満点、味を 8

点満点, 調和を 4 点満点とした合計 20 点満点の評点法で評価すると同時に任意でプロフィールについて自由記述した。

(6) ワインの成分分析

有機酸と遊離アミノ酸は高速液体クロマトグラフィーにより分析した。

有機酸の分析条件は, カラムを GL-C610H-S, カラムオープン温度を 60°C, 溶離液を 5 mM 過塩素酸溶液, 溶離液流量を 0.5 mL/min, 発色試薬をプロモチモールブルー, 反応液流量を 0.6 mL/min, 検出を 440 nm により分析した。遊離アミノ酸は第 II 章と同様にフェニルイソチオシアネートによる誘導体化処理をして高速液体クロマトグラフィーにより分析した。グリセロールは第 II 章の糖分析と同一の方法により分析した。

揮発成分は 15 mL 容ガラスバイアル瓶に 5 mL のワインを加えて, ヘッドスペースガスを固相マイクロ抽出 SPME 法 (DVB/Carboxen/PDMS, 50/30 μ m, Supelco 社) により吸着してガスクロマトグラフ質量分析計で測定した⁶⁰⁾。GC-MS の分析条件は, カラムを DB-Wax 30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 mm, キャリアガスをヘリウム, サンプリング時間を 3 分, 気化

室を 250 °C, 流速を 1 mL/min, イオン源温度を 220 °C, インターフェイス温度を 250 °C, 電子イオン化 (EI) を 70 eV として, カラムの温度プログラムは 40 °C, 4 分間保持, 90 °Cまで 5 °C/min で上昇し, 230 °Cまで 12 °C/min で上昇した後, 最後に 7 分間保持して分析した。

得られたデータは *Student* の t 検定により有意差を検定した。

3. 実験結果

(1) ワイン醸造適性の評価

ワイン醸造に用いる酵母に重要な性質である亜硫酸耐性とアルコール耐性を評価した。TW15 は 100 ppm の亜硫酸濃度でも顕著に増殖した。一方, アルコール濃度が 10%以上になると増殖が抑制され, 13%以上になると増殖することができなかった (表 V-1)。

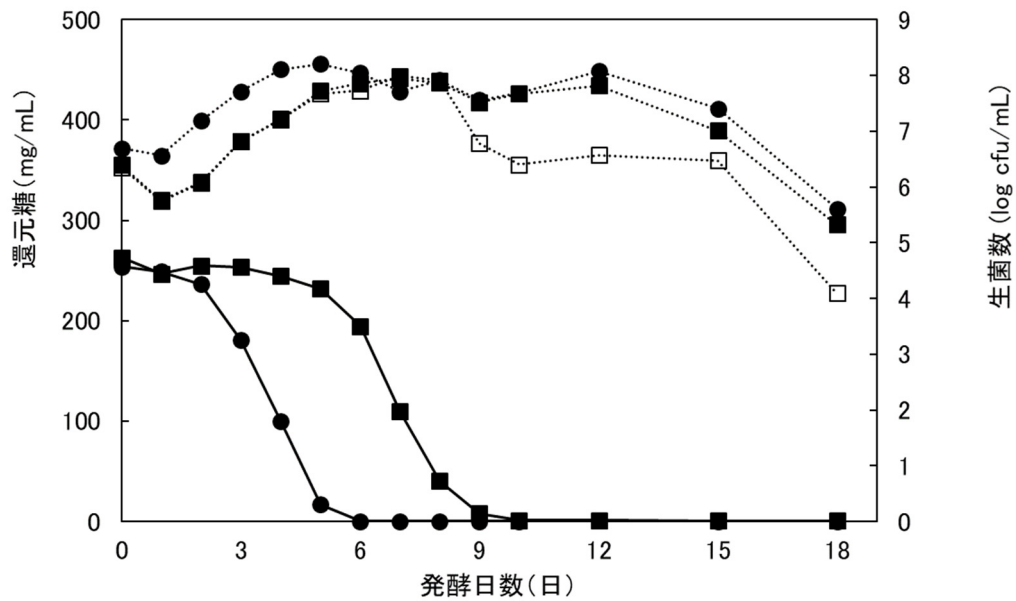
表V-1. TW15のワイン醸造試験適性

	亜硫酸濃度 (ppm)				エタノール (%)										
	25	50	75	100	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
TW15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	W	W	-	-

+ : 生育, W : わずかに生育, - : 生育しない

(2) ワインの発酵経過

ワイン発酵中の還元糖濃度の推移ならびにクロラムフェニコール添加 PDA 培地によるワイン中の全酵母数, 最少セロビオース-リジン培地により TW15 の菌数の推移を分析したところ, TW15 は市販ワイン製造用乾燥酵母と異なる発酵経過を示した (図 V)。両菌株とも酵母の菌数が 5×10^7 cfu/mL を越えると還元糖濃度が大きく減少しはじめたが, この菌数に達するまでに DV10 は発酵開始から 3 日, 一方の TW15 は発酵開始から 5 日を要した。これは山幸ブドウ果醪の低い pH (3.2), 高い糖濃度, 低い発酵温度 (15°C) などの複合的な要因により生じたものと考えられた。発酵開始から 8 日目までは全酵母数とほぼ同じ菌数を維持したが, TW15 は糖をほぼ消費する 9 日目以降, 全酵母に占める割合が減少した。これは 8 日目にはアルコール濃度が 10.1% (分析値) を超えたため TW15 の増殖が著しく弱まり, 原料ブドウに由来するアルコール耐性の高い野生酵母が優勢になったものと考えられた。



図V. TW15 と DV10 によるワイン発酵経過の比較

H. vineae TW15 と *S. bayanus* DV10 (市販ワイン用乾燥酵母) の山幸ブドウの果醪発酵中の還元糖 (実線), PDA 培地と最少リジンセロビオース培地による生菌数 (点線)。各シンボルはそれぞれ—■—, TW15 の還元糖; —●—, DV10 の還元糖; …■…, TW15 の酵母数; …●…, DV10 の酵母数; …□…, TW15 のみの生菌数である。

(3) ワインの品質評価

H. vineae TW15 と市販ワイン醸造用乾燥酵母を発酵に用いたワインの品質を国税庁所定分析法に従って評価した (表V-2)。アルコール濃度, pH, 還元糖, 着色度いずれも TW15 を発酵に用いたワインが高く, 総酸は低かった。なお, この還元糖は酒類総合研究所標準分析法注解に従って分析した値である。TW15 とワイン酵母として最も一般的な菌株のひとつである *S. cerevisiae* OC-2 は糖濃度およそ 9.5% に調製した YPD 培地を 25 °C, 5 日間静置して発酵すると, エタノール濃度がそれぞれ 4.3% と 4.2% であった。TW15 は *S. cerevisiae* と同等にアルコール変換能力の高い菌株であると推察された。

ワインの官能評価に熟練したパネル 10 名による評価は TW15 を発酵に用いたワインが香り, 味, 調和において高い傾向であり, 総合得点では TW15 が有意に高い評価結果であった (表V-3)。香りはパネルの半数である 5 名が TW15 を発酵に用いたワインを高く評価した。一方で, TW15 を発酵に用いたワインの香りを低く評価したパネル 1 名は酢酸エチル臭がしたとコメントした。味は過半数以上である 7 名のパネルが TW15 を発酵に

用いたワインを高く評価した。任意の自由記述によるパネルのコメントは酸味が穏やか、おとなしいというコメントであった。調和は6名のパネルがTW15を発酵に用いたワインを高く評価した。また、特に訓練されたパネル4名による評価は香りと調和は3名がTW15を発酵に用いたワインを高く評価し、どちらも残りの1名は同等と評価した。味については4名全員がTW15を発酵に用いたワインを高く評価した。

TW15を発酵に用いたワインの可溶性成分、揮発性成分ともに特徴的な結果が得られた(表V-4,5)。遊離アミノ酸濃度はセリン、チロシンを除く17種がDV10を発酵に用いたワインより低かった。有機酸は、特にリンゴ酸がDV10を発酵に用いたワインのほうが高く、総有機酸濃度もTW15を発酵に用いたワインが8.20 g/Lに対してDV10が9.25 g/Lであった。グリセロールはわずかにTW15を発酵に用いたワインが高かった。揮発性成分ではイソブチルアルコール、2-フェニルエチルアルコールなどの高級アルコール、酢酸エチル、酢酸イソアミル、酢酸2-フェニルエチルなどの酢酸エステルがわずかに面積値が高い傾向であり、モノテルペンのシトロネロール、ゲラニオール、リナロールはほぼ同等であった。

表V-2. TW15 と DV10 によるワインの品質評価

	アルコール	エキス	pH	総酸 (g/L)	還元糖 (g/L)	色	
	(%)	(%)				420 nm	530 nm
TW15	12.33	3.5	3.62	9.79	3.2	2.142	2.705
DV10	11.52	3.4	3.55	10.97	2.8	2.074	2.568

表V-3. TW15 と DV10 によるワインの官能評価

	色	香り	味	調和	総合
TW15	2.8 ± 0.6	2.7 ± 0.7	4.3 ± 1.4	2.6 ± 0.5	12.4 ± 2.2 ^a
DV10	2.7 ± 0.7	2.3 ± 0.7	3.6 ± 1.6	2.1 ± 0.6	10.7 ± 2.3 ^b

n = 10

各列の異なるアルファベットは有意差があることを示す($P < 0.05$)。

表V-4. TW15 と DV10 によるワインの可溶性成分

化合物	TW15	DV10
遊離アミノ酸 (mg/L)		
アスパラギン	6.34	11.15
アスパラギン酸	4.68	5.35
アラニン	2.81	5.35
アルギニン	8.58	11.94
イソロイシン	1.48	3.03
グリシン	3.78	4.97
グルタミン	4.66	7.23
グルタミン酸	8.00	9.15
システイン	5.22	8.41
スレオニン	12.94	17.23
セリン	15.27	8.93
チロシン	0.00	0.00
バリン	0.54	0.91
ヒスチジン	14.35	18.72
フェニルアラニン	0.98	2.32
プロリン	330.48	355.32
メチオニン	0.34	0.48
リジン	1.11	2.77
ロイシン	2.75	8.41
総遊離アミノ酸	424.32	481.67
有機酸(g/L)		
クエン酸	0.90	0.81
コハク酸	0.94	1.19
酢酸	0.13	0.13
酒石酸	0.82	0.79
DL-乳酸	0.20	0.21
リンゴ酸	5.21	6.13
総有機酸	8.20	9.25
その他 (g/L)		
グリセロール	0.97	0.89

表V-5. TW15 と DV10 によるワインの揮発成分

化合物	香り*	相対面積 (%)		面積比 (TW15/DV10)
		TW15	DV10	
アルコール				
イソブチルアルコール	ワイン, 溶剤, 苦い	0.072	0.048	1.58
イソアミルアルコール	ウイスキー, モルト, 焦げ	6.336	6.78	0.98
1-ウンデカノール	マンダリン	0.012	0.004	4.00
エタノール	甘い	19.271	23.641	0.85
1-オクタノール	コケ, ナッツ, キノコ	0.021	0.019	1.17
2-フェネチルアルコール	蜂蜜, スパイス, バラ, リラ	3.100	2.820	1.15
1-ヘプタノール	香草	0.047	0.051	0.97
1-ヘキサノール	樹脂, 花, 緑草	1.829	1.269	1.51
総アルコール		30.689	34.633	0.93
酸				
カプリル酸	甘い, チーズ	0.137	0.147	0.98
カプリン酸	腐敗, 脂肪	0.081	0.064	1.34
酢酸	酸	0.337	0.340	1.04
総酸		0.556	0.551	1.06
エステル				
カプリル酸エチル	フルーツ, 脂肪	1.661	2.070	0.84
カプリン酸エチル	ブドウ	0.890	0.925	1.01
カプロン酸エチル	リンゴの皮, フルーツ	0.787	1.038	0.80
酢酸イソアミル	バナナ	0.335	0.225	1.57
酢酸エチル	パイナップル	1.027	0.217	4.90
酢酸 2-フェニルエチル	バラ, 蜂蜜, タバコ	0.064	0.024	2.87
パルミチン酸エチル	ワックス	0.092	0.085	1.15
ラウリン酸エチル	葉	0.154	0.147	1.11
総エステル		5.012	4.731	1.11
テルペン				
シトロネロール	バラ	0.035	0.023	1.71
ゲラニオール	バラ, ゲラニウム	0.050	0.044	1.21
リナロール	花, ラベンダー	0.011	0.013	0.88
総テルペン		0.096	0.079	1.27

* Flavornet : <https://www.flavornet.org/flavornet.html>

4. 考察

近年、ワイン醸造に関わる Non-*Saccharomyces* 属酵母が幅広く研究されており、Non-*Saccharomyces* 属酵母のなかでも *Hanseniaspora* 属酵母はワインの発酵初期段階において酵母菌叢の最大75%を占めるという報告があるほど主要な酵母である⁶¹⁻⁶³⁾。26S rRNA 遺伝子配列からブドウまたはワインから分離された *Hanseniaspora* 属酵母は *H. valbyensis*, *H. guilliermondii*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *H. thailandica*, *H. meyeri*, *H. clermontiae* のグループと *H. vineae*, *H. osmophila*, *H. occidentalis* のグループに分けられる。酢酸 2-フェニルエチルなどの酢酸エステルを多量に生成してワインのフルーティーな香りを高めることが報告されている *H. vineae* はその好ましい添加効果だけでなく、潜在的なワイン醸造への適応性の高さも報告されている^{23, 62, 64)}。ワイン醸造において酵母に影響を与える大きな要因にアルコールと亜硫酸が挙げられる。一般に Non-*Saccharomyces* 属酵母はアルコール耐性が低く、*Hanseniaspora* 属酵母も多くは 3~5%程度 of アルコール耐性しか持たないが、*H. vineae* は 10%のアルコール耐性を持っていたと報告されている⁶³⁾。これはアルコールデヒドロゲナーゼをコ

ードする *ADH* 遺伝子が *H. vineae* は *S. cerevisiae* と同じ 8 つ, *H. osmophila* は 6 つ, *H. guilliermondii*, *H. uvarum* 及び *H. opuntiae* は 4 つあり, この *ADH* の遺伝子数がアルコール耐性ならびにアルコール発酵能力と関連していると考えられている。もう一方の亜硫酸耐性に重要な亜硫酸イオン排出ポンプをコードする *SSU1* 遺伝子配列は *Hanseniaspora* 属酵母のなかでは *H. vineae* と *H. osmophila* のみ見つかっている⁶⁵⁾。本研究で試験した *H. vineae* TW15 はアルコール耐性と亜硫酸耐性の両方を兼ね備えており, 実規模スケールのワイン醸造に十分適応可能な適性を備えていると考えられた。

H. vineae によるシャルドネワインの発酵速度は *S. cerevisiae* と比べて遅くなるが, よりボディ感が増してアロマやフレーバーが多様な好ましい風味のワインが得られると報告している⁶⁴⁾。TW15 を発酵に用いた山幸ブドウの発酵も市販ワイン用乾燥酵母よりも遅かったが, ワインの品質は好ましいものであった。特に評価された味は酸味が穏やかであることが評価されており, これは総酸と pH が影響したと考えられる。総酸は 0.02~0.05%, pH は 0.05 の違いで識別が可能と考えられており⁶⁶⁾, 特に総酸は TW15 が

1.18 g/L も低かったため TW15 の酸味が穏やかに感じられたと考えられた。香りの評価に関連する揮発性成分は適量の高級アルコールとエステルが存在が重要である⁶⁷⁾。SPME を用いた GC-MS による揮発性成分の面積値の比較から次のことが考えられた。17 種の遊離アミノ酸を TW15 のほうがより多く消費し、このうちバリン、ロイシン、フェニルアラニンそれぞれを出発物質とする高級アルコールもしくはその酢酸エステルであるイソブチルアルコール、酢酸イソアミル、2-フェニルエチルアルコール及び酢酸 2-フェニルエチルは TW15 のほうが面積値が高かった。DV10 の菌種である *S. bayanus* はイソブチルアルコール、イソアミルアルコール、2-フェニルエチルアルコールなどの高級アルコールと酢酸 2-フェニルエチルの生成量が多く、中でも酢酸 2-フェニルエチルは *S. cerevisiae* のおよそ 12 倍もの量を生成すると報告されている⁶⁸⁾。TW15 はイソアミルアルコールを基質とする酢酸イソアミルの面積値が高かったためイソアミルアルコールの面積値は低かったが、その他の成分は DV10 よりも高かった。*H. vineae* は芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする *ARO8* 及び *ARO9* とフェニルピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする *ARO10* の遺伝子重

複が報告されており⁴³⁾、これにより 2-フェニルエチルアルコール及び酢酸 2-フェニルエチルの増加が起きたものと考えられる。ただし、酢酸エチルの面積値も高く、一名のパネルが酢酸エチル臭とコメントしていたことから、その面積値は酢酸エチルの閾値濃度である 18 ppm 程度に達していたものと推察される⁶⁹⁾。したがって、酢酸エチルの生成を抑制する必要があるものの、TW15 の高級アルコール、酢酸エステル生成能は高品質のワイン製造に有用な性質であると考えられた。

ワインの製造に関与する *Non-Saccharomyces* 属酵母は主に原料のブドウに由来するが、ブドウに生息している酵母は地域的に異なることが分かっており、これがテロワール概念の一因とも考えられている⁶³⁾。TW15 の分離源であった山幸ブドウを原料に製造したワインは若々しく華やかなアロマが特徴と報告されており⁷⁰⁾、TW15 が華やかな香りを持つエステル化合物や芳香族化合物の合成に優れた酵母であったことは先の仮説を支持する結果であった。

山幸ブドウから分離した TW15 は亜硫酸耐性とアルコール耐性の両方を持つワイン醸造適性を備えた菌株であることが分かった。また、山幸ブド

ウを原料とした実規模の試験醸造により、TW15 が山幸ワインの特徴でもある華やかな香りを持つエステル化合物の合成に優れた酵母であることも分かった。本研究のようにワイン用ブドウに生息している酵母を調査し、これらの酵母によるワインの品質への影響を解析することはワインのオリジナリティを高め、さらなる高品質化につながることを期待できるものと考えられた。

VI. 総括

酵母による発酵食品は古くから人類に親しまれ、より高品質で安定的に発酵食品を生産するために *S. cerevisiae* が使用されてきた⁷¹⁾。Non-*Saccharomyces* 属酵母はアルコール発酵及びパン工業への利用は *S. cerevisiae* ほど一般的ではないが⁷²⁾、アルコール飲料の製造では Non-*Saccharomyces* 属酵母菌体のみまたは *Saccharomyces* 属酵母との混合菌体を醸造スターターとして使用することによって製品の香りが改善されているなど有益な報告がされている⁷³⁻⁷⁷⁾。*Hanseniaspora* 属酵母はワイン用ブドウから分離された Non-*Saccharomyces* 属酵母の菌叢中で優勢であり⁷⁸⁾、そのなかでも菌数が多かったものは *H. uvarum* だったが、実験室レベルの実験で最もワインの芳香を高めた菌株は *H. vineae* だったと報告している⁷⁹⁾。また、他の報告でもワイン醸造に *H. vineae* 株を利用することで明確により優れた品質が得られたことが確認されている^{40,41)}。その一方で、*H. vineae* はアミノ酸の消費量が多いため共存する *S. cerevisiae* の発酵が遅延する可能性があることや、*H. vineae* の特性をワイン醸造により活かすために栄養源に関する研究、*H. vineae* が生成する特徴的な揮発成

分である酢酸 2-フェニルエチルを増加する *S. cerevisiae* との共発酵もしくは連続発酵に関する研究，さらに *S. cerevisiae* との発酵を改善するための通気条件に関する研究など，直近で様々な *H. vineae* の有効利用に関する報告がされている⁸⁰⁻⁸²⁾。一方で，製パン業界における Non-*Saccharomyces* 属酵母の利用は，*Torulaspota delbrueckii* が高糖濃度と冷凍耐性があるため特殊な製パン法に有用であるとして注目されている⁸³⁾。また，Zhou らは *H. vineae* によって味と香りに優れたパンが得られたと報告していたが，スクロースを発酵しない *H. vineae* の製パンへの利用についてはあまり注目していなかった⁶⁵⁾。*H. vineae* を製パン業界への技術移転を見据えて研究報告した事例は確認している限り本研究が初である。

本研究は市販酵母と差別化された風味を形成する有用酵母を探索して，池田町ブドウ・ブドウ酒研究所で栽培されていたワイン用ブドウ「山幸」から *H. vineae* TW15 を分離した。TW15 はスクロースを発酵しないため，製パンへの利用及び菌体の工業生産をするためには課題があった。製パン利用への課題については第 II 章では安価な異性化糖を使用し，第 III 章では異性化糖を使用せずに発酵種法のひとつであるレーズン種で課題を解決し，

これらによって得られたパンは市販パン酵母によるものと差別化された好ましい風味であった。第IV章では菌体の製パンへの利用だけでなく、工業生産も可能にするため *S. cerevisiae* との混合培養法を開発し、これにより得られた菌体はスクロースを配合したパン生地も発酵可能となり、市販パン酵母と差別化された TW15 特有の風味のパンも得られ、製パン利用と菌体の工業生産の両課題を解決した。さらに第V章ではこれまでの *H. vineae* のワイン醸造への有用性に関する報告と同様に、TW15 が官能的に優れたワインの製造に有望な菌株であることを明らかにした。本研究によって開発された TW15 の培養方法及び発酵食品の製法を基に十勝地域のオリジナル性が高く、高品質な地域特産品が開発されることが期待される。

VII. SUMMARY

Recently, Non-*Saccharomyces* yeasts have attracted attention for improving and differentiating fermented products quality. Fermentative yeast strain TW15 was isolated from the grape cultivar 'Yamasachi'. It was identified as *Hanseniaspora vineae* based on the ribosomal D1/D2 domain. TW15 couldn't ferment sucrose but it showed higher fermentation ability in medium containing a fructose and glucose mixture (55 : 45) compared with five other *H. vineae* strains and four *S. cerevisiae* baking strains. The baking tests using a fructose and glucose mixture (55 : 45) revealed that TW15 produced larger specific volume in baked products than the baking strain. The results of preliminary sensory evaluation showed that the product of TW15 had a more distinct and desirable flavor than commercial baker's yeast *S. cerevisiae* HP467. Compared with bread samples produced by HP467, the amount of acetoin was much higher in bread samples made with TW15.

The practical and simple method to make baked products having desirable quality without the addition of monosaccharides were tried to develop using raisin extracts fermented by *H. vineae* TW15. When the strain TW15 was incubated in the raisin extracts (20 g/100 mL) at 25 °C for 2 days with standing, the fermented extracts showed high leavening ability in dough. Thus, baking tests were conducted using these extracts as a substitute of baker's yeast. As compared with baked products using the extracts fermented by conventional strain of *S. cerevisiae*, the analysis results of volatile compounds revealed that the breads made by the extracts of strain TW15 showed desirable quality with floral aroma. The results seem to show

that the strain TW15 could be readily applied to bread making using fermented raisin extract.

TW15 was applied along with the baking strain *S. cerevisiae* to the conventional dough containing sucrose. The liquid fermentation ability of sucrose was elevated with increasing the ratio of *S. cerevisiae* cells, which secrete external invertase. The baking strain was then inoculated along with *H. vineae* TW15 and both strains were grown with sucrose. When the mixed strains were used for the conventional dough including sucrose, the baked products showed a distinct and acceptable quality similar to those made by TW15 alone. These results showed that TW15 can be applied to the conventional bread making method by mixing a baking strain.

The suitability of winemaking using TW15 isolated from 'Yamasachi' grapes was tested and a winemaking test using 'Yamasachi' grapes was conducted to analyze the fermentation of the wine and evaluate its quality. TW15 was found to have high tolerance against both sulfite and alcohol as well as the ability suitable for winemaking. TW15 had a slower fermentation rate than the commercial dry wine yeast, but improved the wine quality. The taste was highly related for its weak sourness due to its low levels of total acids and high pH. It was assumed that the wine aroma characteristics by TW15 were highly related the production of more isobutyl alcohol, isoamyl acetate, 2-phenylethyl alcohol, and 2-phenylethyl acetate.

In this study, methods for culturing and producing fermented foods with a desirable flavor by TW15 were developed. Results obtained in this study expect that high-quality regional special products with high originality in the Tokachi region will be developed.

VIII. 参考文献

- 1) 菅野信男. 酵母の話. *醸協*. 67, 1, 23-27, 1972.
- 2) 小田有二, 大内弘造. パン製造にはどのような酵母が必要か. *化学と生物*. 29, 4, 258-263, 1991.
- 3) Peter, J., Chiara, M. D., Friedrich, A., Yue, J-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G., and Schacherer, J. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556, 339–344, 2018.
- 4) Bigey, F., Segond, D., Friedrich, A., Guezenec, S., Bourgeois, A., Huyghe, L., Agier, N., Nidelet, T., Sicard, D. Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes. *Curr. Biol.*, 31, 4, 722-732. 2021.
- 5) Alsammar, H. F., Naseeb, S., Brancia, L. B., Gilman, R. T., Wang, P., and Delneri, D. Targeted metagenomics approach to capture the

biodiversity of *Saccharomyces* genus in wild environments. *Environ.*

Microbiol. Rep., 11, 206-214, 2019.

- 6) 田中康夫, 松本博. 製パンの科学 (II) 製パン材料の科学. 光琳, 57-98, 1992.
- 7) 小泉武夫. 発酵食品学. 講談社, 28-321, 2012.
- 8) 赤尾健. 清酒酵母のゲノム解析: その現状と展望. *醸協*, 107, 6, 366-380, 2012.
- 9) 大室繭. ビールづくりの主役: ビール酵母の特徴と発酵力の鍵 ビール酵母の発酵力に寄与する因子の解明. *化学と生物*, 58, 3, 157-163, 2020.
- 10) 後藤昭二. ワイン酵母の特性と優良菌株の選択育種. *日本農芸化学会誌*, 63, 12, 1885-1887, 1989.
- 11) 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. *生物工学*, 90, 6, 329-334, 2012.
- 12) 志賀勝栄. 酵母から考えるパンづくり. 柴田書店, 10-21, 2007.
- 13) 小玉健太郎, 北浦睦, 宮本芳夫, 保坂孝雄, 菅浦敏夫, 岩田通, 笠

松 篤龍, 谷口昌也. 「海水から分離した酵母を用いるパンの製造法」特開平 6-52. 1992.

- 14) 小玉健吉, 高橋慶太郎. 「酵母, 冷凍パン生地, 乾燥パン酵母, 発酵食品, 含塩発酵食品及び発酵食品製造方法」特開 2001-178449. 2001.
- 15) 飯塚良雄, 渡邊悟. 天然パン酵母. 特開 2006-325562. 2006.
- 16) Oda, Y., Mikumo, D., Tajima, K., and Yamauchi, H. Characterization of an alternative baking strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented cherry fruits by the analysis of *SUC2* gene. *Food Sci. Technol. Res.*, 16, 45-50. 2010.
- 17) Mikumo, D., Takaya, M., Orikasa, Y., Ohwada, T. Improved Leavening Ability of a Wild Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* AK46 2-deoxyglucose Resistant Mutant. *Food Sci. Technol. Res.*, 21, 4, 623-630, 2015.
- 18) Hittinger, C. T., Steele, J. L., and Ryder, D. S. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49,

199-206, 2018.

- 19) Raymond Eder, M. L., Reynoso, C., Lauret, S. C., and Rosa, A. L.

Isolation and identification of the indigenous yeast population during spontaneous fermentation of Isabella (Vitis labrusca L.) grape must. *Front. Microbiol.*, 8, 532, 2017.
- 20) Liu, S., Laaksonen, O., and Yang, B. Volatile composition of bilberry wines fermented with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations. *Food Microbiol.*, 80, 25-39, 2019.
- 21) Morales, M. L., Fierro-Risco, J., Ríos-Reina, R., Ubeda, C., and Paneque, P. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* co-inoculation on volatile profile in fermentations of a must with a high sugar content. *Food Chem.* 276, 427-435, 2019.
- 22) Zhang, B. Q., Luan, Y., Duan, C. Q., and Yan, G. L. Use of *Torulaspora delbrueckii* co-fermentation with two *Saccharomyces cerevisiae* strains with different aromatic characteristic to improve the

- diversity of red wine aroma profile. *Front. Microbiol.* 9, 606, 2018.
- 23) Lleixà, J., Martín, V., Portillo, M., del, C., Carrau, F., Beltran, G., and Mas, As. Comparison of Fermentation and Wines Produced by Inoculation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.*, 7, 338, 2016.
- 24) Zhou, N., Schifferdecker, A.J., Gamero, A., Compagno, C., Boekhout, T., Piškur, J., and Knecht, W. *Kazachstania gamospora* and *Wickerhamomyces subpelliculosus* : Two alternative baker's yeasts in the modern bakery. *Int. J. Food Microbiol.*, 250, 45–58, 2017.
- 25) 農林水産省. 令和 2 年度食料需給表. 2021.
- 26) 農林水産省. 作物統計調査「令和元年産農林水産関係市町村別統計 (小麦)」。2020.
- 27) 総務省統計局. 家計調査「品目分類：支出金額・名目増減率・実質増減率 (二人以上の世帯)」。2021.
- 28) 国税庁課税部酒税課. 国内製造ワインの概況 (平成 30 年度調査分)。2020.

- 29) Yunoki, K., Yasui, Y., Hirose, S., and Ohnishi, M. Fatty acids in must prepared from 11 grapes grown in Japan : Comparison with wine and effect on fatty acid ethyl ester formation. *Lipids*, 40, 361-367, 2005.
- 30) Kasuga, J., Tsumura, Y., Kondoh, D., Jitsuyama, Y., Horiuchi, R. and Arakawa, K. Cryo-scanning electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape 'Yamasachi' is accompanied by partial dehydration. *J. Plant. Physiol.*, 253, 153248, 2020.
- 31) Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., and Robert, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In "The Yeasts, a Taxonomic Study", Vol. 1, ed. by C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout. Elsevier, Amsterdam, pp. 87-110, 2011.
- 32) Aslankoochi, E., Herrera-Malaver, B., Rezaei, M. N., Steensels, J., Courtin, C. M., and Verstrepen, K. J. Non-conventional yeast strains increase the aroma complexity of bread. *PLoS One*, 11, e0165126,

2016.

- 33) Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y., and Toko, K. Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors*, 10, 3411-3443, 2010.
- 34) Zhu, Y., Luo, Y., Wang, P., Zhao, M., Li, L., Hu, X., and Chen, F. Simultaneous determination of free amino acids in Pu-erh tea and their changes during fermentation. *Food Chem.*, 194, 643-649, 2016.
- 35) Oda, Y., Yajima, Y., Kinoshita, M., and Ohnishi, M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiol.*, 20, 371-375, 2003.
- 36) Santiago, D. M., Matsushita, K., Noda, T., Tsuboi, K., Yamada, D., Murayama, D., Koaze, H., and Yamauchi, H. Effect of purple sweet potato powder substitution and enzymatic treatments on bread making quality. *Food Sci. Technol., Res.* 21, 159-165, 2015.
- 37) Cadez, N. and Smith, M. T. *Hanseniaspora Zikes* (1912) . In "The

Yeasts, a Taxonomic Study", Vol. 2, ed. by C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout. Elsevier, Amsterdam, pp. 421-434, 2011.

- 38) Romano, P. and Suzzi, G. Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 62, 2, 309–315, 1996.
- 39) Birch, A. N., Petersen, M. A., and Hansen, Å. S. The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT-Food Sci. Technol.*, 50, 480-488, 2013.
- 40) Wei, J., Wang, S., Zhang, Y., Yuan, Y., and Yue, T. Characterization and screening of Non-*Saccharomyces* yeasts used to produce fragrant cider. *LWT-Food Sci. Technol.*, 107, 191-198, 2019.
- 41) Zhang, B. Q., Shen, J. Y., Duan, C. Q., and Yan, G. L. Use of indigenous *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to improve the aroma diversity of Vidal blanc icewine. *Front. Microbiol.*, 9, 2303, 2018.

- 42) Martin, V., Giorello, F., Farina, L., Minteguiaga, M., Salzman, V., Boido, E., Aguilar, P. S., Gaggero, C., Dellacassa, E., Mas, A., and Carrau, F. *De novo* synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 4574-4583, 2016.
- 43) Giorello, F., Valera, M. J., Martin, V., Parada, A., Salzman, V., Camesasca, L., Farina, L., Boido, E., Medina, K., Dellacassa, E., Berna, L., Aguilar, P. S., Mas, A., Gaggero, C., and Carrau, F. Genomic and transcriptomic basis of *Hanseniaspora vineae*'s impact on flavor diversity and wine quality. *Appl Environ Microbiol.*, 85, e01959-18, 2019.
- 44) Comasio, A., Harth, H., Weckx, S., and De Vuyst, L. The addition of citrate stimulates the production of acetoin and diacetyl by a citrate-positive *Lactobacillus crustorum* strain during wheat sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 289, 88-105. 2019.
- 45) Romano, P., and Suzzi, G. Origin and production of acetoin during

- wine yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 309-315, 1996.
- 46) Parker, K., Salas, M. and Nwosu, V. C. High fructose corn syrup : production, uses and public health concerns. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 5, 71-78, 2010.
- 47) 神戸孝雄. レーズン種を使用した製パン法について. *食品と科学*. 4, 102-106, 1999.
- 48) Wei, J., Zhang, Y., Wang, Y., Ju, H., Niu, C., Song, Z., Yuan, Y., and Yue, T. Assessment of chemical composition and sensorial properties of ciders fermented with different Non-*Saccharomyces* yeasts in pure and mixed fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, 318, 108471, 2019.
- 49) Fang, Y., and Qian, M. Aroma compounds in Oregon Pinot Noir wine determined by aroma extract dilution analysis (AEDA). *Flavour Frag. J.*, 20, 22-29, 2005.
- 50) López, M. C., Mateo, J. J., and Maicas, S. Screening of β -glucosidase

and β -xylosidase activities in four Non-*Saccharomyces* yeast isolates.

J. Food Sci., 80, C1696-C1704, 2015.

51) 下村吉治. 分岐鎖アミノ酸代謝の調節機構. *日本栄養・食糧学会*

誌, 65, 3, 97-103, 2012.

52) Carlson, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species.

J Bacteriol., 169, 4873-4877, 1987.

53) 中富康夫, 原克彦, 梅田二三男. 「パン酵母の培養法」特開昭 62-

220185, 1987.

54) Viana, F., Belloch, C., Valles, S., and Manzanares, P. Monitoring a

mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in

natural must : impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J.*

Food Microbiol., 151, 235-240, 2011.

55) Fleet, G. H. Yeast interactions and wine flavor. *Int. J. Food.*

Microbiol., 86,11-22, 2003.

56) Lambrechts, M. G., and Pretorius, I. S. Yeast and its Importance to

Wine Aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21,97-129, 2000.

- 57) Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., and Suárez, J. A. Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.*, 106 (2) , 123-129, 2006.
- 58) Ali, N. M., and Khan, M. M. Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts. *Curr Res Microbiol Biotechnol.*, 2 (1) , 316-324, 2014.
- 59) 独立行政法人酒類総合研究所, 酒類総合研究所標準分析法注解, [https : //www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.html](https://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.html) (2017) .
- 60) W. Cai, F. Tang, Z. Guo, X. Guo, Q. Zhang, X. Zhao, M. Ning and C. Shan. Pretreatment methods affecting the color, flavor, bioactive compounds and antioxidant activity of jujube wine. *Food Chem.*, 330 (15) , 127330, 2020.
- 61) Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., and Pretorius, I. S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 27 (1) , 15-39, 2006.

- 62) Martin, V., Valera, M. J., Medina, K., Boido, E., and Carrau, F.
Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on
Wines. *Fermentation*, 4 (3) , 76, 2018.
- 63) Borren, E., and Tian, B. The Important Contribution of Non-
Saccharomyces Yeasts to the Aroma Complexity of Wine. *Foods*, 10
(1) , 13, 2021.
- 64) Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M. E., Barquet,
M., Gaggero, C., Dellacassa, E., and Carrau, F. Increased flavour
diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-
fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.*, 141 (3) ,
2513-2521, 2013.
- 65) Valera, M. J., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. Comparison of
the Glycolytic and Alcoholic Fermentation Pathways of *Hanseniaspora*
vineae with *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts. *Fermentation*, 6
(3) , 78, 2020.
- 66) 横塚弘毅. ワインの味とにおい(2). *調理科学*, 22 (2) , 94-101, 1989

- 67) 横塚弘毅. ワインの味とにおい(1). *調理科学*, 22 (1) , 29-36, 1989
- 68) 岸本宗和, 相馬英一, 篠原隆, 後藤昭二. *Saccharomyces bayanus* と *Saccharomyces cerevisiae* のワイン醸造学的特性比較. *醸協*, 93 (3) , 231-237, 1998.
- 69) Selfridge, T. B., and Amerine, M. A. Odor Thresholds and Interactions of Ethyl Acetate and Diacetyl in an Artificial Wine Medium. *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, 1-6, 1978.
- 70) 山根善治, 武宮重人, 井原信二. 札幌国税局管内で製造されたワインの官能評価と化学成分との相関分析. *醸協*, 112 (8), 578-585, 2017.
- 71) Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., and Hatziloukas, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.*, 6 (1) , 1-31, 2020.
- 72) Mattanovich, D., Sauer, M., and Gasser, B. Yeast biotechnology : teaching the old dog new tricks. *Microb. Cell Fact.*, 13, 34, 2014.
- 73) Gschaedler, A. Contribution of Non-conventional yeasts in alcoholic

beverages *Curr. Opin. Food Sci.*, 13, 73-77, 2017.

- 74) Jiang, Z., Yang, B., Zhang, S., Shan, J., Liu, J., and Wang, X. A novel approach for the production of a Non-alcohol beer ($\leq 0.5\%$ abv) by a combination of limited fermentation and vacuum distillation. *J. Inst. Brew.*, 123, 533-536, 2017.
- 75) Serra Colomer, M., Funch, B., and Forster, J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 56, 30-35, 2018.
- 76) Van Rijswijck, I. M. H., Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Abee, T., and Smid, E. J. Performance of Non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. *Microb. Biotechnol.*, 10, 1591-1602, 2017.
- 77) Varela, C. The impact of Non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 9861-9874, 2016.
- 78) Mendoza, L. M., Vega-Lopez, G. A., Fernández de Ullivarri, M., and

- Raya, R. R. Population and oenological characteristics of Non-*Saccharomyces* yeasts associated with grapes of Northwestern Argentina. *Arch. Microbiol.*, 201, 235-244, 2019.
- 79) Carrau, F., Gaggero, C., and Aguilar, P. S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol.* 33, 148-154, 2015.
- 80) Zhang, B., Xu, D., Duan, C., and Yan, G., Synergistic effect enhances 2-phenylethyl acetate production in the mixed fermentation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.*, 90, 44-49, 2020.
- 81) Yan, G., Zhang, B., Joseph, L., and Waterhouse, A. L. Effects of initial oxygenation on chemical and aromatic composition of wine in mixed starters of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 90, 103460, 2020.
- 82) K. Medina, E. Boido, E. Dellacassa and F. Carrau. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.*, 157,

245-250, 2012.

83) Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M. J., Spencer-Martins, I.,

Leão, C., and Sousa, M. J. Sugar utilization patterns and respiro-

fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspota delbrueckii*.

Microbiology, 153, 898-904, 2007.