

新解説 グルテンフリー食品での サワードウ / 乳酸菌の重要性

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2}

竹内 美貴 (TAKEUCHI Miki)³ 中村 智英子 (NAKAMURA Chieko)³

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会会長, ³ 神戸女子短期大学

Key Words : グルテンフリー サワードウ / 乳酸菌

本論文「新解説 グルテンフリー食品でのサワードウ / 乳酸菌の重要性」は“Gluten-Free Cereal Products and Beverages” (Edited by E. K. Arendt and F. D. Bello) 2008 by Academic Press (ELSEVIER) の第 12 章 Sourdough/lactic acid bacteria by M. Gobbetti *et al.*, を翻訳紹介するものである。

サワードウ / 乳酸菌

サワードウ

サワードウの利用は、食品発酵中、天然の膨化のスタート剤として最も古いバイオテクノロジー加工法の一つである (Rocken and Voysey, 1995)。サワードウは粉 (例えば小麦, ライ麦), 水, 他成分 (例えば NaCl) の混合物で、天然にある乳酸菌, イーストによって発酵される。これらの微生物は主には粉, 加工装置から来るが, サワードウ微生物相の結果的構成は、内部 (例えば, 粉の化学成分, 酵素成分) と外部 (例えば, 発酵過程の温度, 潜在的酸化還元能, ドウ生成, 時間) 要因によって決まって来る (Hammes and Ganzle, 1998)。成熟したサワードウは乳酸菌主体で、そこには $>10^8$ cfu/g が見られ、一方イーストの数はずっと低いオーダーである (Ehrmann and Vogel, 2005)。全体的にはサワードウ発酵には 3 標準プロトコールがあり、区分がされている (Bocker *et al.*, 1995; De Vuyst and Neysens, 2005)。タイプ I サワードウは、伝統的テクニックで生産するもので、連続的に毎日新鮮な状態に微生物を活性状態に維持する特徴があり、それらは高活性状態で示され

る。その加工は室温で (20-30°C) すすめられ、サワードウの最終 pH は約 4.0 である。タイプ II サワードウは主にドウ酸性化剤 (acidifier) として用いられる。発酵は 2-5 日, $>30^\circ\text{C}$, スピードアップしながらその加工は続き、発酵の 24 時間後 pH は <3.5 になる (Hammes and Ganzle, 1998)。微生物は成長のステーションナリー相の後半 (late) になり、制限メタボリック活性を示す。タイプ III は、乾燥サワードウで粉の状態であり、スターターカルチャーと明示して発酵する。製パン中の酸性化剤, 芳香キャリアーとして用いる。タイプ I, II, III サワードウに対する対照として、ペーカーズイーストの添加 (*Saccharomyces cerevisiae*) が発酵に用いられる (De Vuyst and Neysens, 2005)。この分け方を気にせず、職人および工業技術者らは、多くの別の伝統的な、あるいは独自のプロトコールを用いている (Gobbetti *et al.*, 2005)。

サワードウ乳酸菌

微生物学の研究から、乳酸菌 50 種以上、イーストは 25 種類以上、特に一般の

Saccharomyces と *Candida* に属するものが成熟したサワードウ中に見られる事が示された。

サワードウはユニークな食品生態系で、その中に (i) その環境に合った乳酸菌種が選択され (ii) 各サワードウには特異的な乳酸菌集団が潜んでいる (Gobbetti 1998; De Vuyst *et al.*, 2002; Gobbetti *et al.*, 2005; De Vuyst and Neysens 2005)。

サワードウ乳酸菌の代表的なものは *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* である (表 12.1) (De Vuyst and Vancanneyt, 2007)。最も大きな生物多様性は *Lactobacillus* 属に見られ、相対的に高い種数が最近見つかった (Hammes and Gunzle, 1998; De Vuysens, 2005; Valcheva *et al.*, 2005, 2006; Vancanneyt *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2006; Scheirlink *et al.*, 2007)。*Lactobacillus salivarius* group 以外、分離された代表的サワードウは *Lactobacillus* 属内 (<http://11141,150,157,117;8080/prok PUB/index.htm>) に最近区別された各系統発生グループに見出される。サワードウ発酵に用いられるプロトコールによると、主に義務的および偶発的なヘテロ発酵性乳酸菌の様々な微生物共同体が見出される。*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, さらに特に *Lactobacillus sanfranciscensis* は鍵になるサワードウバクテリアで (Gobbetti and Corsetti, 1997), 一般には伝統的タイプ I サワードウから分離できる。Type II サワードウは、主に *L. brevis*, *L. fermentum*, *Lactobacillus frumenti*, *L. pontis*, *Lactobacillus pantis*, および *Lactobacillus reuteri* (De Vuyst and Van canneyt, 2007) である。

サワードウの性質と機能

天然でそのまま無添加のイメージとは別に、一般にサワードウは焼きもの食品に用いられるといろいろなプラスの効果ある事が判っている。他の膨剤 (例えばベーカーズイースト) と比べると、テクスチュア、フレーバー、栄養価、保存性等を改良する (表 12.2)。サワードウイ

ーストの役割にもかかわらず、上述の効果を決める乳酸菌の主なメタボリック性質が主に以下述べられる。

テクスチュア

乳酸による酸性化のレベルに基づいて、サワードウの利用で製パン容積の増加を引き起こす (Corsetti *et al.*, 2000; Crowley *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2002)。ベーキング前にドウ伸展に対する抵抗性低下、および伸展性、ソフト性両方の増加が示された (Di Cagno *et al.*, 2002)。全体的にサワードウ発酵は、パンドウ中のガス保持性を改良する (Hammes and Ganzle, 1998; Clarke *et al.*, 2002)。酸性化は、グルテン、デンプン、アラビノキシランのような構造形成成分の溶解性に影響を与え、穀物内部酵素活性とプラスに関与している (Korakli *et al.*, 2001)。乳酸酸性化はまたそれによりドウの攪拌性に影響し、低 pH に達した時、正常なドウよりも短い攪拌時間とより低い安定化に達する (Hoseney, 1994)。

フレーバー

サワードウ乳酸菌による可溶性炭水化物 (例えばマルトース、グルコース、フラクトース) の発酵、窒素化合物のメタボリズム、および揮発性物質の生成は、直接あるいは間接的に焼き物のフレーバーに影響する。Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, 任意的ヘテロ発酵種) と phosphogluconate (義務的ヘテロ発酵種) エネルギー経路を超え、(i) 外的電子受容体 (例えばフラクトース) と NADH co-factor の recycling (Vermeulen *et al.*, 2006; Ganzle *et al.*, 2007) の利用、(ii) 階層的利用 (例えばヘキソースのかわりペントース) (Gobbetti *et al.*, 2000) と同時利用 (例えばクエン酸塩とマルトースの共発酵) でいろいろなエネルギー源を用い (Gobbetti and Corsetti 1996), (iii) 内部酵素と外部内部酵素の相互作用 (Di Cagno *et al.*, 2003) はいろいろな発酵の比率を導き (乳酸と酢酸の間のモル比) 焼き物のフレーバーにい

表 12.1 サワードウから分離された乳酸菌

種	サワードウ のタイプ	義務的 ヘテロ発酵	任意的 ヘテロ発酵	義務的 ホモ発酵	<i>Lactobacillus</i> 系統 グループ ^a	Reference
<i>L. b^bbrevis</i>	I/II/III	x			<i>L. buchneri</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> , 2005
<i>L. fermentum</i>	I/II	x			<i>L. reuteri</i>	Hammes and Ganzle, 1998
<i>L. paralimentarius</i>	I	x			<i>L. plantarum</i>	Cay <i>et al.</i> , 1999
<i>L. plantarum</i>	I/II		x		<i>L. plantarum</i>	De Vuyst and Vancanneyt, 2007
<i>L. pontis</i>	I/II	x			<i>L. reuteri</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1994
<i>L. sanfranciscensis</i>	I/I	x			<i>L. buchneri</i>	Weiss and Schilinger, 1984
<i>L. panis</i>	II	x			<i>L. reuteri</i>	Wiese <i>et al.</i> , 1996
<i>L. reuteri</i>	I/II	x			<i>L. reuteri</i>	De Vuyst and Neysens, 2005; Corsetti <i>et al.</i> , 2004
<i>L. spicheri</i>	IPRWS-I ^c		x		<i>L. buchneri</i>	Meroth <i>et al.</i> , 2004
<i>L. rossiae</i>	TS ^d	x			<i>L. reuteri</i>	Corsetti <i>et al.</i> , 2005
<i>L. zymae</i>	TS	x			<i>L. buchneri</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> , 2005
<i>L. acidifarinae</i>	TS	x			<i>L. buchneri</i>	Vancanneyt <i>et al.</i> , 2005
<i>L. hammesii</i>	TS	x			<i>L. buchneri</i>	Valcheva <i>et al.</i> , 2005
<i>L. nantensis</i>	TS			x	<i>L. plantarum</i>	Valcheva <i>et al.</i> , 2006
<i>L. buchneri</i>	I	x			<i>L. buchneri</i>	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. fructivorans</i>	I	x			<i>L. buchneri</i>	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>W. e^ecibaria</i>	I	x			NI ^f	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>MW. confusa</i>	II	x			NI	Muller <i>et al.</i> , 2001; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. Alimentarius</i>	I		x	x	<i>L. Plantarum</i>	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. Casei</i>	I		x		<i>L. casei</i>	De Vuyst and Neysens, 2005
<i>L. acidophilus</i>	I/II				<i>L. delbruecki</i>	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. delbruecki</i>	I/II			x	<i>L. delbruecki</i>	Hammes and Ganzle, 1998; Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. amylovorus</i>	I/II	x			<i>L. delbruecki</i>	Muller <i>et al.</i> , 2001
<i>L. farcimints</i>	I/II			x	<i>L. plantarum</i>	Hammes and Ganzel, 1998 Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>L. frumenti</i>	II	x			<i>L. reuteri</i>	Muller <i>et al.</i> , 2000
<i>L. johnsonii</i>	II			x	<i>L. delbruecki</i>	Muller <i>et al.</i> , 2001 Vogel <i>et al.</i> , 1999
<i>P. e^gpentosaceus</i>	III		x		NI	De Vuyst and Neysens, 2005
<i>L. siliginis</i>	TS		x		<i>L. reuteri</i>	Aslam <i>et al.</i> , 2006
<i>L. namurensis</i>	TS	x			<i>L. buchneri</i>	Scheirlinck <i>et al.</i> , 2007
<i>Lc. h^hmesenteroides</i>	I	x			NI	Arendt <i>et al.</i> , 2007
<i>Lc. citreum</i>	TS	x			NI	De Vuyst and Neysens, 2005

^a <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.

^b *L. Lactobacillus*.

^c IPRWS-I, Industrial processed rice and wheat sourdough type i.

^d TS, Traditional sourdough.

^e *W. Weissella*.

^f NI, Not included.

^g *P. Pediococcus*.

^h *Lc. Leuconostoc*.

表 12.2 サワードウの性質と機能

性質	効果	作用機作	Reference
食感	Increase of the bread volume	Lactic acidification	Corsetti <i>et al.</i> , 2000; Crowly <i>et al.</i> , 2002; Clarke <i>et al.</i> , 2002;
	Decrease of the dough resistance to extension	Lactic acidification	Di Cagno <i>et al.</i> , 2002
	Increase of the dough extensibility and softening	Lactic acidification	Hammes and Ganzle, 1998;
	Improvement of the dough gas retention	Lactic acidification	Clarke <i>et al.</i> , 2002
フレーバー	Increase of the synthesis of acetic acid	Embden-Meyerhof-Parnas and phosphogluconate energy routes	Ganzle <i>et al.</i> , 2007; Vermeulen <i>et al.</i> , 2006
		Use of external acceptors of electrons	
		Recycling of NADH co-factors	Gobbetti <i>et al.</i> , 2000;
		Hierarchical and simultaneous use of various energy sources	Gobbetti and Corsetti, 1996
		Interactions with endogenous and exogenous enzymes	Di Cagno <i>et al.</i> , 2003
栄養	Improvement of the texture and palatability of whole grain and fiber-rich bread	Secondary proteolysis	
		General catabolism of free amino acids	Gobbetti, 1998; Thiele <i>et al.</i> , 2002;
		Arginine deiminase pathway	Gobbetti <i>et al.</i> , 2005; Kieronczyk <i>et al.</i> , 2001; De Angelis <i>et al.</i> , 2002; Schieberle, 1996
栄養	Stabilization or increase of the levels of various bioactive compounds	Lactic acidification	Katina <i>et al.</i> , 2005
		Lactic acidification	Liukkonen <i>et al.</i> , 2003
		Degradation of phytate	De Angelis <i>et al.</i> , 2003; Lopez <i>et al.</i> , 2001; Katina <i>et al.</i> , 2005
		Lactic acidification and unknown mechanisms	Ostman <i>et al.</i> , 2002; De Angellis <i>et al.</i> , 2007a
保存性	Decrease of the rate of bread staling	Lactic acidification	Corsetti <i>et al.</i> , 2000;
		Probable slight degradation of starch molecules	Crowley <i>et al.</i> , 2002
保存性	Anti-ropeness activity Anti-bacterial activity Anti-fungal activity	Lactic acidification	
		Synthesis of bacteriocins, bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) Synthesis of low-molecular mass antibiotic reutericyclin Synthesis of antifungal Metabolites (e.g. acetic, Caproic and formic acids and phenyllactic and 4-hydroxy-phenyllactic acids)	Kirchener and Von Holy 1989; Schnurer and Magnusson, 2005; Corsetti <i>et al.</i> , 2004; Holtzel <i>et al.</i> , 2000; Gobbetti <i>et al.</i> , 2005; Corsetti <i>et al.</i> , 1998; Lavermicocca <i>et al.</i> , 2003

ろいなる影響を与える。

全体的に乳酸菌のサワードウ発酵は遊離アミノ酸 (FAAs) の増加を示し、一方イーストだけのドウ発酵では FAAs の濃度は低下する (Gobbetti 1998)。サワードウ発酵の間、タ

ンパク質分解は次に分類される ; (i) 第一は、タンパク質を特に粉内部プロテアーゼにより分解して中間サイズのポリペプチドにし、そして (ii) 第二に中間サイズのポリペプチドから、特に乳酸菌ペプチダーゼシステムによ

る FAAs は直接フレーバーに寄与する (Thiele *et al.*, 2002; Gobbetti *et al.*, 2005)。一度遊離されると FAAs は、直接フレーバーに寄与するかあるいは、あるいはベーキングの間か、あるいは酵素的カタボリズムでさらに化学的変化 (Kieronczyk *et al.*, 2001) し、揮発性フレーバー成分の合成へと進む。FAAs のカタボリズムの中でサワードウ乳酸菌のアルギニン・デヒミナーゼ経路 (ADI) のあらわれは実際の事で明らかに顕著である。 *L. sanfranciscensis* CB1 (De Angelis *et al.*, 2002) 中のこの経路のあらわれは、成長と酸性の環境下ストレスに対する抵抗性を強め、さらに、特にオルニチンの合成を強め、それが2-アセチル-ピロリンの前駆体となり、小麦パンクラストのこげのしるしに関係する (Gobbetti *et al.*, 2005)。アルコール、アルデヒド、ケトン、酸、エステル、エーテル誘導体、フラン誘導体、炭化水素、ラクトン、ピラジン、ピロール誘導体、硫黄化合物は焼き物中でできたフレーバー刺激物である (Schieberle, 1996)。サワードウに相当するアミノ酸レベルを化学的に酸性化したドウは、パンのフレーバーをほんの僅かだが改良した (Thiele *et al.*, 2002)、このことは元々の揮発成分が直接にサワードウへの顕著な役割を示している。全体的に、ホモ乳酸発酵菌は主にジアセチル、アセトアルデヒド、ヘキサノールの生産で特徴づけられ、ヘテロ乳酸発酵菌はエチルアセテート、アルコール、アルデヒド、イソアルコール (2-methyl-1-propanol, 2,3-methyl-1-butanol) の生産で特徴づけられ、各々のアルデヒド、エチルアセテートはイースト発酵の揮発成分の特徴である (Damiani *et al.*, 1996)。

栄養

サワードウ発酵はいろいろな面で穀物の健康面を改良する;それは (i) 全粒および繊維性穀物のテクスチャ、食味改良, (ii) いろいろな生化学成分の安定, 増加, (iii) デンプンの生化学的活性の保存 (低グリセミックインデックス食品); さらに (iv) 金属の生化学的活

性の改良 (Katina, *et al.*, 2005) である。乳酸酸性は、生理活性化合物レベルを上げ (例えばフェノール性物質), あるいはチアミン, フェルラ酸デハイドロダイマー, トコフェロールのレベルを下げた (Liukkonen *et al.*, 2003)。サワードウ加工でフィチン酸の分解が金属の生化学的有用性を増加するようになる (Lopez *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2003)。さらに乳酸酸性化はまた、マグネシウムやリン酸の溶解性をあげ (Katina *et al.*, 2005) パン中の β -グルカンの保護要因になると判った。有機酸は例えばサワードウ発酵の間生産され、食後の血糖反応に於ける役割を演じている。乳酸の存在が加熱処理の間、デンプンとグルテン間の相互作用を促進し、デンプンの生化学的利用性を低下し、その結果の焼いた物のグリセミックインデックスを落とす (Ostman *et al.*, 2002)。最後に生化学的酸性化の効果は、化学的な酸性化によるよりも効果は大きいようだ (De Angelis *et al.*, 2007a)。

保存性

サワードウの発酵による、パン比容積、クラムソフトネスの改良は、パン老化スピードの低下と関係している (Corsetti *et al.*, 2000; Crowley *et al.*, 2002)。抗老化効果は特別な株の発酵のためで、さらに酸性化の程度と結びつくもの以外の動力学と関与する。その上、デンプン分子は乳酸菌により合成された酵素で影響受け、それはデンプンの老化にいろいろな変化を起こし、順次老化速度を低下させる。

サワードウ発酵中生じる酸性化は、芽胞の発芽を阻害し、さらにロープ菌腐敗に関係する *Bacillus* spp. の成長を阻害する (Kirschner and Von Holy, 1989)。さらにいろいろな成分 (例えば有機酸, ハイドロゲンパーオキシド, ジアセチル) 以外、サワードウ乳酸菌は他の関係する微生物をバクテリオシン, バクテリオシン様阻害剤物質 (BLIS) の合成によって阻害する (Corsetti *et al.*, 2004; Gobbetti *et al.*, 2005), そして低分子量マウス抗体物質, 例えば *L. reuteri*

LTH2584 の reutericyclin のようなもの (Holtzed *et al.*, 2000) で阻害する。多くの抗カビ物質、例えばサイクリックジペプチド、フェニルラクチックアシド、タンパク性化合物、および、3-hydroxylated fatty acids は乳酸菌により強く合成された (Schnurer and Magnusson 2005; Dal Bello *et al.*, 2007)。有機酸の混合物(例えば酢酸、カプロン酸、蟻酸)は相乗作用で働き、パンの悪変に関係するカビに対し *L. sanfranciscensis* CB1 の *in vitro* 阻害活性に関係するものである (Corsetti *et al.*, 1998)。Phenyl lactic acid と 4-hydroxy-phenyllactic acid は *L. plantarum* 20B によって合成された抗カビ物質であり、*Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, 及び *Monilia* に対し阻害効果を示す (Lavermicocca *et al.*, 2003)。

グルテンフリー食品中へのサワードウの応用

もしもサワードウの利用が、これまでの焼き物製造に多くのプラスの効果があるならば、グルテンフリー食品の応用にと考慮することは自然であろう。全体的に、マーケット上のグルテンフリー食品は低品質で、貧弱な口腔内食感とフレーバーを示す (Gallagher *et al.*, 2004)。それはグルテンを含まず、主にデンプンベースのもので、老化はグルテン含有パンよりも素早く始まる (Moore, 2005)。その上、グルテンフリー粉の利用を最も一般的なもの(例えば米、コーン、デンプン等)に制限すると、非常に低い食物繊維含量と過剰のカロリーによる栄養欠乏症が起こる (Diowksz *et al.*, 2006)。にもかかわらず、最近の論文にグルテンフリー食品にサワードウを利用していることを書いた論文数が非常に少ない。僅かな利用結果だが、サワードウがベーキング品質上、特にパン容積、テクスチャ、フレーバーにプラスの効果を示した。異なる乳酸菌株で発酵されたサワードウのグルテンフリーパンのテクスチャ品質への貯蔵中の影響が評価され、さらに化学的に酸性化したドウや非酸性化ドウと比較された (Clarke *et al.*, 2002; Growley *et al.*, 2002)。

選択された乳酸菌のグルテンフリーバクター中での成長と小麦サワードウ中での成長とが似ているものであると報告された (Clarke *et al.*, 2002)。サワードウ発酵はドウの粘弾性に増加を起し、老化を遅らせた (Ryan *et al.*, 2006)。これらの効果は、主にはサワードウ乳酸菌による非グルテンタンパク質とデンプン成分の破壊によるものである。トライアングルテスト(3点比較法)から、グルテンフリーサワードウパンはコントロールパンと区別でき、明らかに好まれるものであった。最近の patents (Giuliani *et al.*, 2006) では、*L. Sanfranciscensis* LS40 と LS41、および、以前これまでサワードウから分離された *L. plantarum* CF1 が選ばれた。

この微生物混合物はグルテンフリー成分(例えばコーンスターチ、米、ソバ、きび粉)の発酵に用いられ、ベーカーズイースト発酵と比較した。サワードウ発酵は研究者たちに (i) 約 300ppm グルテンの完全な分解するもので、時にはコンタミも存在する; (ii) 約 10 倍の FAAs 濃度の増加するもの; (iii) 発酵中約 10 倍フィターゼ活性の増加するもの; (iv) 最終的パンの官能特徴が記述分析評価できるように改良されたと理解させた。最近の patents (Sikken and Lousche 2003) には *L. fermentum* を利用して高品質のグルテンフリー食品の製造ができることを記述してある。官能、テクスチャ、栄養面の改良の点から、市販のグルテンフリー食品製造に用いるサワードウの利用を勧める。

サワードウ乳酸菌によるグルテン脱毒方法

一般的傾向をこえて、幾つかの環境要因がセリアック病の広がりに影響する。最近疫学研究から、各人が主にヨーロッパ起源の国々でしばしば見出されているだけではなく、セリアック病は農業が始まって1万年以上たっている文明世界の多くの地域では、普通の病気である事を示している。もっと最近、穀物食品生化学は全人類の食事習慣がこれまでグルテンにさらされていた影響で大きく急激に変化した。穀物焼物食品は最近、加速的加工方法で工業的に

製造され、さらにサワードウの長期発酵は無差別的に化学膨剤およびベーカリー酵母膨化剤の工業的利用によって非常にしばしば置き換えられてきた (Gobbetti, 1998)。これらの条件下で、伝統的なサワードウ製パンの生化学は最近、食品加工の間、毒性エピトープを分解する事のできるように巧みに利用されて来た。この分野における多くの研究は、著者らによってすすめられており、医学的専門家とのジョイントプロジェクトでサワードウ乳酸菌の大きなプロテアーゼ効果の働きを示したが、それらは *Flavobacterium meningosepticum* (Pyle *et al.*, 2005), *Myxococcus xanthus* (Shan *et al.*, 2004), および *Aspergillus niger* (Stepniak *et al.*, 2006) からのプロリンエンドペプチダーゼ (PePs) である。

サワードウ乳酸菌の選択

腸内プロテアーゼによる分解の間、主には小麦 (α -, β -, γ -, ω - グリアジンサブグループ)、ライ麦 (例えばセカリン)、大麦 (例えば

ホールデン) のプロラミンからは一連の プロリン-, およびグルタミン-リッチポリペプチドが引き離され、これらは不適当な T cell- 媒介免疫反応に関係してくる (Sollid and Khosla, 2005)。未だ検討中、毎月更新されるが、幾つかのフラグメント (f) は疑いもなく毒性ありと定義される ; 例えば α_2 - gliadin の f31-43 (Picarelli *et al.*, 1999), α_2 -gliadin f62-75 (Shan *et al.*, 2002), α_2 - gliadin の f 57-89 に相応する 33-mer epitope (Shan *et al.*, 2002), γ -gliadin の f134-153 (Aleanzi *et al.*, 2001), α_2 - gliadin の f 57-89 (Arentz-Hansen *et al.*, 2000) である。最近、グルテニンにも毒エピトープを生産する不可解な区域のあることが判った (Molberg *et al.*, 2003)。全体的にこれら毒ペプチドのアミノ酸配列中、プロリン残基の大きな比率とその位置関係はそれらをさらに加水分解されるのに極端な抵抗性を与えている (Hausch *et al.*, 2002)。これらペプチドを十分に処理するためには、ペプチド結合を加水分解するのに一連の特別のペプチダーゼが必要であるが、そこにはプロリン残基

表 12.3 選択した lactobacillus (*Lactobacillus alimentarius* 15M, *Lactobacillus brevis* 14G, *Lactobacillus sanfranciscensis* 7A, and *Lactobacillus hilgardii* 51B) サワードウのプロリン残基をもつ各種基質 への酵素活性^a

Source of enzyme activity	Substrate (concentration [mM])	Average activity(U) \pm SD ^a
Cells ^b	Pro-p-NA (2)	0.3 \pm 0.01 ^d
Cells	Gly-Pro-p-NA (2)	5.2 \pm 0.03
Cells	Z-Gly-Pro-NH-Trifluoromethylcoumarin(2)	12.3 \pm 0.4 ^e
Cells	Val-Pro (2.3)	2.1 \pm 0.03 ^f
Cells	Pro-Gly (3)	1.9 \pm 0.04
Cells	Gly-Pro-Ala (2)	2.2 \pm 0.02
Cells	Bradykinin (0.3)	5.5 \pm 0.3
Cells	Fragment 62-75 of A-gliadin (0.45)	9.7 \pm 0.5
Pooled cells and CE ^c	Fragment 62-75 of A-gliadin	15.0 \pm 0.5
Cells	33-mer (0.200)	0.08 \pm 0.002
Pooled cells and CE	33-mer	0.2 \pm 0.01

^aEach value is the average of three enzyme assays, and standard deviations were calculated.

^bAliquots (25 μ L) of each cell suspension were used in the enzyme assays.

^cAliquots (12.5 μ L) of the pooled cells and cytoplasmic extracts (CE) of each species were used in the enzyme assays.

^dA unit of enzyme activity on p-NA substrates was defined as the amount of enzyme that produced an increase in absorbance at 410nm of 0.01/min.

^eA unit of enzyme activity on Z-Gly-Pro-NH-trifluoromethylcoumarin was the amount of enzyme that produced an increase in fluorescence of 0.1/min.

^fA unit of enzyme activity on di-, tri-, and polypeptides was the amount of enzyme that liberates 1 μ mol of substrate/min. From Di Cagno *et al.*, (2004).

が重要な物質として存在している。

乳酸菌サワードウは、長い発酵期間の間、多種のしかも複雑な酵素活性をもつ細胞工場として利用されるものと考えられてきた。1個のユニークな種だけでプロリンを含む可能性のペプチドを加水分解するのに必要なペプチダーゼ類の完全な範囲を所有するのではないため、サワードウ4種—*Lactobacillus alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A, および *Lactobacillus hilgardii* 51B-が、セリアック病患者の胃腸T細胞系に最も強く誘導するペプチド、33-mer peptideの加水分解するための大きな酵素质質特異性と分解能に基づいて選ばれた(表12.3)(Di Cagno *et al.*, 2004)。

以後類似の結果がVSL#3のようなプロバイオテック種の混合物を用いても成就された(De Angelis *et al.*, 2005)。にもかかわらず、VSL#3を成す各種のテストが行われた時、加水分解能は失われたが、このことは1種だけではプロリンリッチポリペプチド分解に必要な完全

なペプチダーゼ範囲を含んでいない事をはっきりさせた(図12.1)。さらにVSL#3は α_2 -gliadinのf62-75を完全に加水分解したが、これはこれまでセリアック病の病因に入る免疫調節性ペプチドとして報告されているものであった(Shan *et al.*, 2002)。酵素複合系の必要性は*L. sanfranciscensis*のX-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (Pep X)の精製とその性質の調査研究からさらに明らかにされた(Gallo *et al.*, 2005)。プロリンリッチ33-mer エピトープが加水分解されないのは、PepXだけで処理された時であった。同様のバクテリアの一般的アミノペプチダーゼタイプNがPepXと結びつくと、33-mer ペプチド(0.2 mmol/L)の完全加水分解は30°Cで24時間培養後に起こった。

結論から言うと、これらの研究(Di Carno *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2005; Gallo *et al.*, 2005)では、選択的サワードウあるいはプロバイオテック乳酸菌は複雑なペプチダーゼ活性をもち、それらは焼き物食品を作る過程でグ

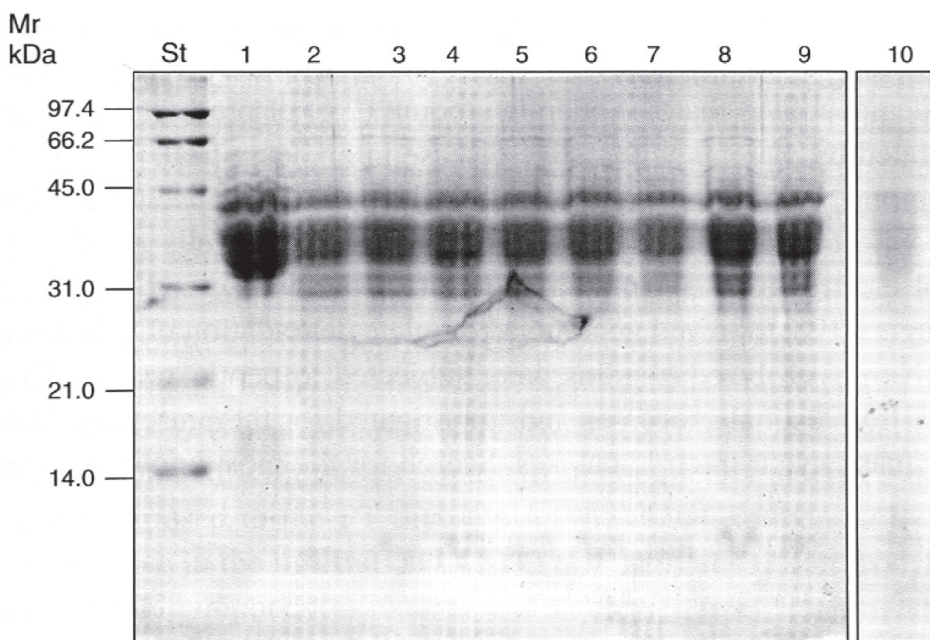


図12.1 VSL#3を調製する各異なる菌(109cfu/mL)で24時間培養した小麦粉ドウからのgliadins polypeptidesのSDS-PAGE分析。標準タンパク質(St)。化学的酸性化ドウ(1); *Bifidobacterium longum*で培養したドウ(2); *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*(3); *L. plantarum*(4); *L. casei*(5); *B. infantis*(6); *L. acidophilus*(7); *Streptococcus thermophilus*(8); *B. breve*(9); およびVSL#3調製(10)。De Angelis *et al.*(2005)

ルテンのエピトープをある程度処理することを示した。

サワードウ小麦パン

小麦 (30%), 非毒性オート麦, アワ, ソバ粉のミックスで作ったサワードウに選択したサワードウ乳酸菌, 上述 (*L. alimentarius* 15 M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A と *L. hilgardii* 51B; 約 10^9 cfu/g dough) のもので, さらに長

期間 (24 時間) 発酵に供した (Di Cagno *et al.*, 2004)。発酵前半液体の小麦粉は, サワードウ乳酸菌酵素に完全にさらされる可能性が不可欠である。殆ど完全なグリアジンの加水分解は達成され, 一方, オート麦, アワ, ソバからのプロラミンは発酵中には影響されない。化学的に酸性化されたドウ, あるいはベーカースイーストだけでスタートしたドウと比較すると, 加水分解はサワードウ乳酸菌のタンパク

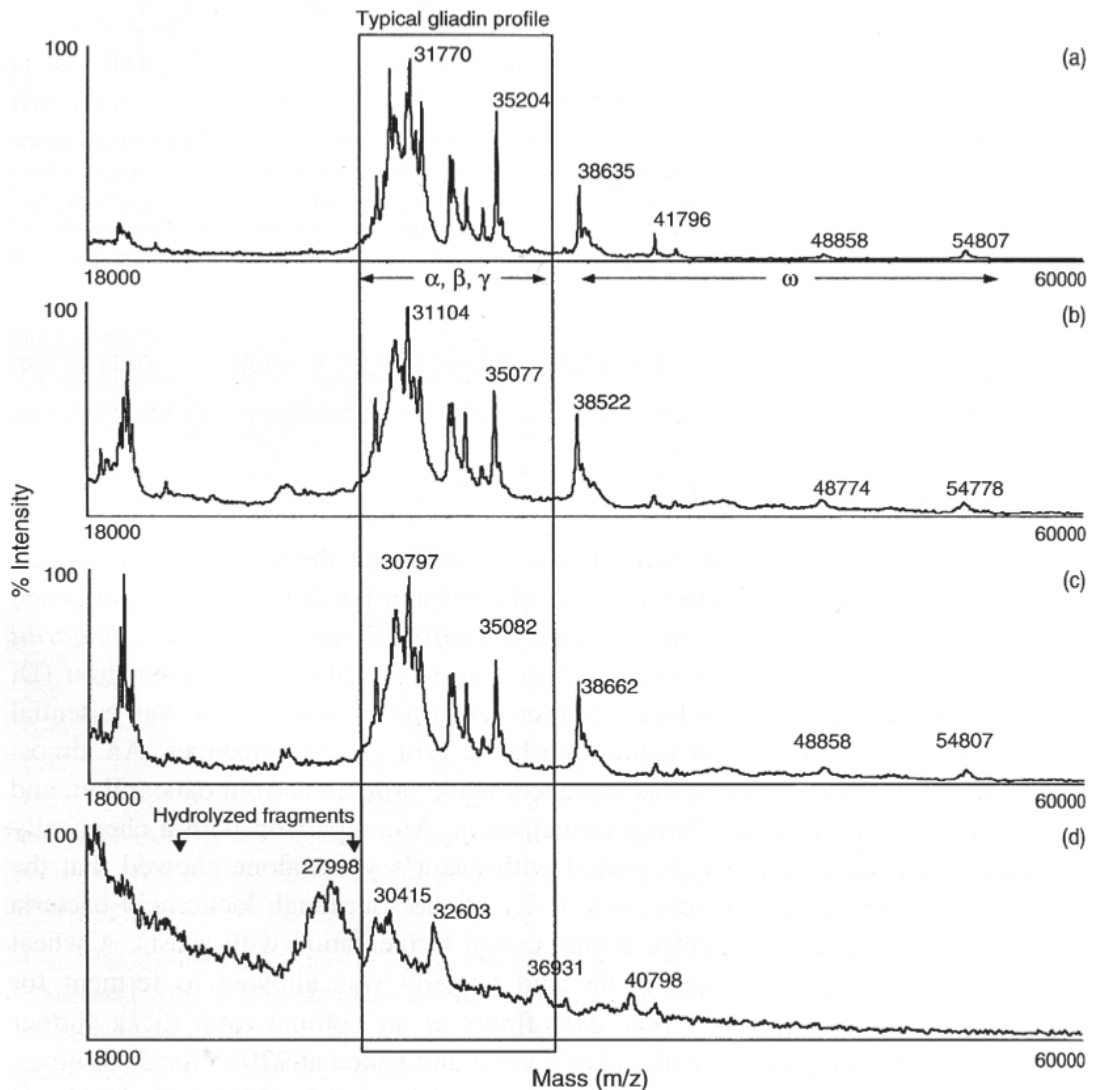


図 12.2 小麦グリアジンの水エタノール抽出物の MALDI-TOF 質量分析スペクトル：(a) ヨーロッパ小麦グリアジン標準 α -, β -, γ -, ω -gliadin の範囲；(b) 化学的酸性化ドウ (コントロール), 37°C 24 時間培養後, (c) 化学的酸性化ドウ, 熱不活性化 VSL#3 で 24 時間 37°C 培養後, (d) VSL#3 で 24 時間 37°C 培養した発酵ドウ。典型的 α -, β -, γ -gliadin は箱に示した。De Angelis *et al.* (2005)

質分解活性によるものであり、さらにグリアジンはイーストによるドウ発酵では影響を受けないという事である。

小麦サワードウは選択された乳酸菌でスタートし、30°C、24時間発酵され、さらに非毒化した粉と最大比(3:7)で混ぜ、さらに2時間30°Cでベーカーズイーストで発酵し、220°C 20分間焼いた。このパンと約2gグルテンを含むベーカーズイーストのパンを作り、セリアック病患者による生体中二重盲検急性課題とした。17患者のうち13人はベーカーズイーストパンの摂取後、腸の透過性に変化が見えた。サワードウパンを食べた同じ13患者は腸の透過性が顕著で、ベースラインの値からはっきりした相違はなかった。残った4人の患者はベーカーズイーストパンあるいはサワードウパンのいずれにも食べた後グルテンに反応を示さなかった。これらの予備の結果が更なる研究を奮い立たせたのは、それらが重大なトライアルから加水分解前の小麦粉の適量(2g)でもセリアック病患者に耐性を示したからである。

プロバイオテック VSL#3 調製剤も、長い発酵のあと小麦粉の毒性を低下させる力を示した(De Angelis *et al.*, 2005)。2次元電気泳動、免疫学(R5抗体)、マスマスプロトメトリー分析(図12.2)は、殆ど完全にグリアジンが発酵後に分解した事を示した。非加水分解グリアジンは peptic-tryptic (PT) 分解にかけると類似の胃腸プロセスになり、マスマスプロトメトリー分析によって既知の毒エピトープの存在が確認された。最も良く知られたエピトープの研究は、非常に低濃度(sub-parts/million range)の α_2 -gliadin f 62-75の存在であった。

これまでの研究、sourdough lactobacilli (Di Cagno *et al.*, 2004) に関し、新しい *in vitro* (試験管内)、*ex vivo* (生体外) 分析は進んでいる。ラット小腸上皮細胞 IEC-6 にコントロールのそのままのグリアジンをさらしたものと比較すると、VSL#3 消化前グリアジンは F-actin の目立たないが再組織化を引き起こし、小腸粘膜透過性の低下効果を映した。Zonulin は、毒ペプチ

ドに答えるメカニズムとして小腸透過性の増加を支える分子であるが(Clemente *et al.*, 2003; Drago *et al.*, 2003)、グリアジンで処理すると小腸上皮細胞から生じるが、VSL#3 で消化するとかかなり低くなった。小麦タンパク質をドウから抽出し PT 消化に供した。化学的に酸性化したドウからの PT 消化物と比較すると、VSL#3 で発酵したドウからの PT 消化物は、セリアック空腸生検で CD3⁺ 皮膚上皮リンパ球の浸潤の増加はなかった。全体的に CD3⁺ 上皮内部リンパ球は、グルテンをセリアック病になった患者からの小腸粘膜にさらすと増加する(Troncone *et al.*, 1998; Mazzarella *et al.*, 2005)。上述の結果から、VSL#3 プロテオバイオテック調製物はグルテンエピトープの毒性を低下する力があった。

発酵デュラム小麦セモリナによるパスタ

小麦サワードウパンで述べたと同じような研究が(Di Cagno *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2005) パスタ製造で行われた。選択した乳酸菌集団がデュラム小麦セモリナの発酵に液状状態で(Di Cagno *et al.*, 2005) 用いられた。発酵後、ドウは冷凍乾燥され、ソバ粉と比率 3:7 で混ぜられ“fusilli”タイプのイタリアパスタを作るのに用いられた。前発酵無しパスタをコントロールとした。2つのタイプのパスタを官能テストした。粘り、かたさのスコアが僅かにコントロールパスタで高かった。香り、フレーバーは2つのタイプのパスタで違いはなかった。2次元電気泳動とマスマスプロトメトリー MALDI-TOF 分析したら、殆ど完全にグリアジン区分の水解が示されていた(図12.3)。R5-Western blot による免疫分析で示すように、グルテン濃度はコントロールパスタで 6280ppm だが発酵パスタは 1045ppm に低下した。

このタイプのパスタは 1045ppm のグルテンをまだ含んでいて、これはセリアック病のトリIGGERであるが、発酵デュラム小麦セモリナを 20% 含む混合物のパスタ仕込みの利用では、理論的にはセリアック病の安全使用濃度内の

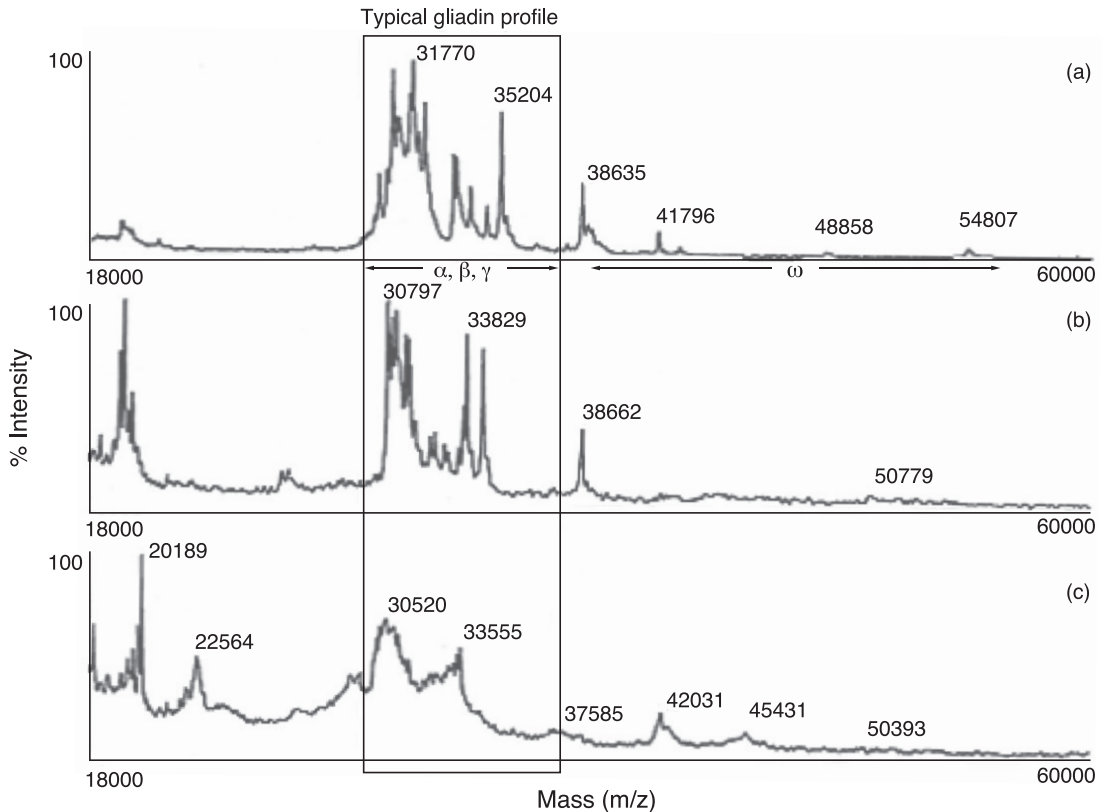


図12.3 小麦デュラムグリアジンの水エタノール抽出物のMALDI-TOF質量分析スペクトル:(a)ヨーロッパ小麦グリアジン標準 α -、 β -、 γ -、 ω -グリアジンの範囲;(b)化学的酸性化ドウ(コントロール), 37°C 24時間培養後,(c)選択した乳酸菌混合でデュラム小麦セモリナを24時間37°C培養した発酵ドウ。典型的 α -、 β -、 γ -gliadinは箱に示した。De Angelis *et al.* (2005)

新規製品になるだろう。グリアジンは、発酵、非発酵デュラム小麦セモリナドウから抽出したものを、さらにPT消化物を作り *in vitro* でヒト骨髄性白血病オリジンの K 563 (S) subclone 細胞への 膠着テストに用いた (Auricchio *et al.*, 1984)。PT消化物全体は膠着を起こさなかった。小麦パン、ライ麦パン、大麦パンとの対照的に、デュラム小麦は decapeptide (10 ペプチド) を含み、PT消化物による膠着を阻止する能力があり、それがセリアック病の阻止効果のようである (De Vincenzi *et al.*, 1998)。アフィニティクロマトグラフィーはPT消化物を3つの区分に分けた。これらの分離区分で唯一の最も小さい区分には、膠着活性が含まれていた。発酵デュラム小麦セモリナのPT消化物のこの区分の最小膠着活性は約80倍ほどデュラム小麦

セモリナのPT消化物より高いが、このことは低下した毒性を示す。これらの結果から、選択したサワードウ lactobacilli の利用はまたグルテン毒性を低下させたデュラム小麦セモリナからパスタ製造に適用できるだろう。

ライ麦発酵

選択されたサワードウの乳酸菌の集団もライ麦中のプロラミンの分解に力を示した (De Angelis *et al.*, 2006)。プロラミンはライ麦粉から抽出され、PT分解物を作りヒトの Caco-2/TC7 細胞で *in vitro* 試験した (De Angelis *et al.*, 1998; Giovannini *et al.*, 2003)。選択したサワードウ乳酸菌によってライ麦PT分解物の加水分解をすすめ、PT分解物自身の毒性は低下し、それは Caco-2/TC7 細胞に対し細胞の生存測

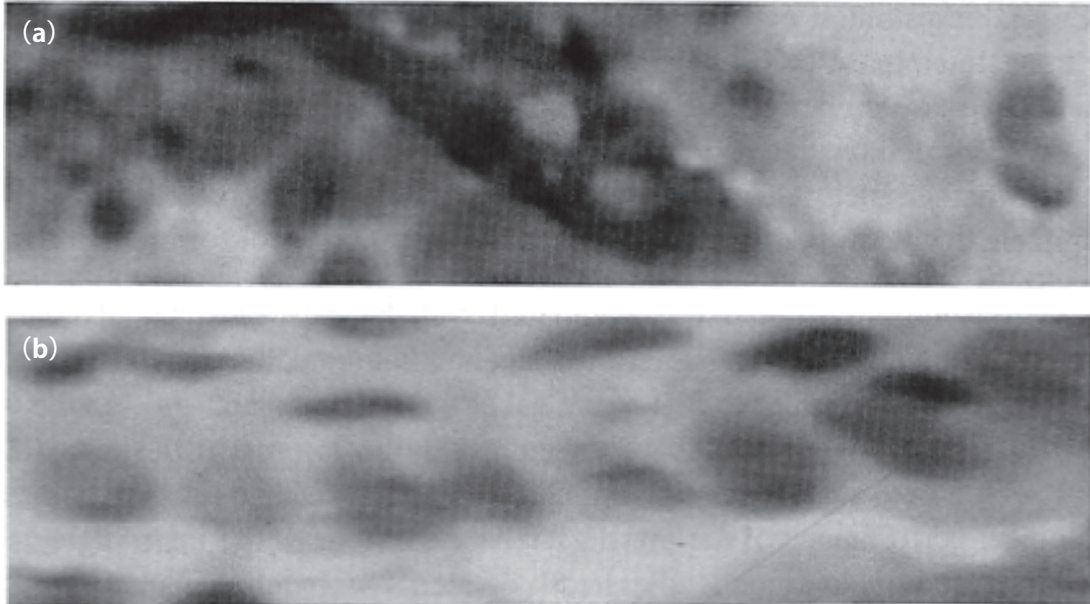


図 12.4 化学的酸性化したドウ (a) から、あるいは選択した乳酸菌で 37℃ 24 時間培養したもの (b) から抽出したセカリン、グルテリンタンパク質の PT 消化物で処理したセリアック病患者標本の Fas expression。元の 200 倍拡大；蛍光組織化学：Red Fuchsin APAAP 染色テクニック。De Angelis *et al.* (2006)

定, caspase-3 活性測定, さらに一酸化窒素の放出により確認された。一方, プロラミンとグルテリンは発酵したライサワードウから抽出され PT 分解に供した。化学的に酸性化したドウから作った PT 分解物と比べ, 乳酸菌によるドウ発酵したものの PT 分解物をセリアック病空腸の生検にさらした物は, CD3+ 内部上皮リンパ球湿潤の増加は示さなかった (図 12.4) が, これは Fas expression で示され, 細胞のアポトーシスの測定である (Maiuri *et al.*, 2001)。

ラクトバチルスとカビプロテアーゼによる高効率グルテン分解

非常に多くのテスト, *in vitro* (例えば膠着性と Caco-2/TC アッセイ), *ex vivo* (生検-derived T cells) と *acute in vivo* (小腸湿潤) がすすめられたが, 上述の結果 (Di Cagno *et al.*, 2004, 2005; De Angelis *et al.*, 2005, 2006) だけがはっきりしたグリアジン区分の低下を示した。このルートはグルテンフリー食品のクロスコンタミの危険性を除去するのに有効であろう, しか

し完全な小麦粉の毒性の除去ではない。結果的に, サワードウ乳酸菌による水解能の増加のために更なる努力が行われた。カビプロテアーゼとともに, 製パンでルーチンに用いられる他のラクトバチルス株は, はっきりとプロリンリッチペプチドに対するペプチダーゼ活性が特徴づけられ (De Angelis *et al.*, 2007b), 半液体状小麦粉ドウの長い発酵に用いられた。R5-サンドイッチ法, および競合法 ELISA でもとめたが, 発酵したサワードウ中のグルテン残渣濃度は <20ppm で, これはグルテンフリー食品の Codex Alimentarius Commission のスタンダードによって要求されるものである。2次元電気泳動と MALD-TOF マスペクトル分析はアルブミン/グロブリンおよびグリアジンの完全加水分解を示した。僅か約 20% のグルテニンが残った。加水分解後, サワードウ発酵しスプレードライした粉は主には水/塩可溶の低分子量ペプチドとアミノ酸の混合物である。

低分子量 エピトープは strong cation-exchange liquid chromatography (SCX-LC) と capillary liquid

chromatography-electrospray ionization (CapLC-ESI)-q-TOF-MSTO R5-Western blot 分析によっても検知されなかった。発酵サワードウから抽出した全てのタンパク質区分の PT 分解物は、*in vitro* で末梢の blood mononuclear cells (PBMCs) の proliferation (分裂急増) と PBMCs による IFN γ 生産、12 人の CD 患者の小腸 T cells lines (iTCLs) の試験に用いた。iTCL アッセイ前に PT 消化物は tissue transglutaminase (tTG)-mediated deamidation を受けた。すべてのタンパク質区分は PBMCs の活性化を示し、ネガティブコントロールとして IFN γ を誘導した。iTCLs のいずれもが PT 消化物に対し免疫反応を示さなかった。この小麦粉が完全なグルテンの加水分解後、確かな製パン性を保持するのに適しているかどうか不確かなため、製パン性の生化学的プロトコールを作り標準化した。サワードウ発酵後、水を除去し、この事前処理した小麦粉をベーカーズイーストと構造助剤を用いて製パンした。このサワードウパンは非処理粉で構造助剤ぬぎのベーカーズイーストパンと比較した。サワードウパンの比容積は、ベーカーズイーストパンの比容積によく似ていて、典型的なサワードウ小麦パンのフレーバーを示すと内部のパネルテストが判断した (Rizzello *et al.*, 2007)。これらの結果は、セリアック病患者が十分耐えられるベーキング食品製造の主成分である事前分解小麦粉の技術的パフォーマンスの研究を大いに奮い立たせるものである。

将来の方向

グルテンフリー食事の承服点は、極端な骨の折れる作業、クロスコンタミに関係する多くの問題、食品ラベリングポリシーの明確な欠除、グルテンリッチの食品と比較して貧弱なグルテンフリー食品の品質のある点である。たとえグルテンフリーシステムの中でサワードウの活用が未だ幼少期と言われても、利用できる文献データは、サワードウが疑いもなくグルテンフリー食品のテクスチャ、フレーバーの特徴を改良するのにその技術的手段として有効であることを強く示している。この伝統的バイオテクノロジーのコマーシャル上の利用は、強く保証されている。一方では、サワードウ乳酸菌の胃腸病気のマネジメント上での役割は“新興と好奇心”とこれまで定義されて来た (Yan and Polk, 2004)。これまでの研究から、サワードウ乳酸菌の利用は、確かに加工食品中のグルテンエピトープのかけらを除去するようであり、世界に広がるセリアック病によって影響される多数の人の長期危険を最少にするだろう。さらに最近、サワードウ乳酸菌とカビプロテアーゼでグルテン <20ppm の濃度に前処理消化した小麦粉だけで作ったパンで、セリアック病患者が小麦パンで効果的な耐性の評価が得られるかどうかを *in vivo* 長期試験でスタートした。

Sources of further information and advice

- De Vuyst, L. and Gänzle, M. eds (2005). *Trends Food Sci. Technol.* Special Issue **16**, 1-124.
- Gobbetti, M. and Gänzle, M. eds (2007). *Food Microbiol*, Special Issue **24**, 113-196.
- Hammes, W. P. and Gänzle, M. G. (1998). In: Woods, B. J. B. eds. *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. I. London: Blackie Academic/Professional, pp. 199-216.

References

- Aleanzi, M., Demonte, A. M., Esper, C., Garcilazo, S., and Waggener, M. (2001). *Clinical Chemistry* **47**, 2023-2028.
- Arendt, E. K., Liam, A., Ryan, M., and Dal Bello, F. (2007). *Food Microbiology* **24**, 165-174.
- Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, O. *et al.* (2000). *J. Exp. Med.* **191**, 603-612.
- Aslam, Z., Im, W. T., Ten, L. N., Lee, M. J., Kim, K. H., and Lee, S. T. (2006). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2209-2213.
- Auricchio, S., De Ritis, G., De Vincenzi, M., Minetti, M., Saporita, O., and Silano, V. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 428-433.
- Böcker, G., Stolz, P., and Hammes, W. P. (1995). *Getreide Mehl Brot* **49**, 370-374.
- Cai, Y., Okada, H., Mori, H., Benno, Y., and Nakase, T. (1999). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1451-1455.
- Clarke, C. I., Schober, T. J., and Arendt, E. K. (2002). *Cereal Chem.* **79**, 640-647.
- Clemente, M. G., De Virgiliis, S. Kang, J. S. *et al.* (2003). *Gut* **52**, 218-223.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. (1998). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 253-256.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paletti, F., and Rossi, J. (2000). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3044-3051.
- Corsetti, A., Settanni, L., and Van Sinderen, D. (2004). *J. Appl. Microbiol.* **96**, 521-534.
- Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F., and Gobbetti, M. (2005). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 587-591.
- Crowley, P., Schober, T., Clarke, C., and Arendt, E. (2002). *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 489-496.
- Dal Bello, F., Dal Bello, C. I., Clarke, L. A. *et al.* (2007). *J. Cereal Sci.* **45**, 309-318.
- Damiani, P., Gobbetti, M., Cossignani, L., Corsetti, A., Simonetti, M. S., and Rossi, J. (1996). *Lebensm. -Wiss. U. -Technol.* **29**, 63-70.
- De Angelis, I., Vicentini, O., Brambilla, G., Stamatii, A., and Zucco, F. (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **152**, 119-127.
- De Angelis, M., Mariotti, L., Rossi, J. *et al.* (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6193-6201.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M. R. *et al.* (2003). *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 259-270.
- De Angelis, M., Rizzello, C. G., Scala, E. *et al.* (2005). *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 80-93.
- De Angelis, M., Coda, R., Silano, M. *et al.* (2006). *J. Cereal Sci.* **43**, 301-314.
- De Angelis, M., Rizzello, C. G., Alfonsi, G. *et al.* (2007a). *Br. J. Nutr.* doi: 10.1017/S0007114507772689.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G. *et al.* (2007b). *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 69-82.
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., Luchetti, R., Silano, M., Gasbarrini, G., and Silano, V. (1998). *Toxicology* **127**, 97-106.
- De Vuyst, L. and Gänzle, M. G. (2005). *Trends in Food Science & Technology Special Issue-Second International Symposium on Sourdough: From Fundamentals to Applications*, Vol. 16. Amsterdam: Elsevier.
- De Vuyst, L. and Neysens, P. (2005). *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 43-56.
- De Vuyst, L. and Vancanneyt, M. (2007). *Food Microbiol.* **24**, 120-127.
- De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, Hoste, B. *et al.* (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6059-6069.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P. *et al.* (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 623-633.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., *et al.* (2003). *Food Microbiol.* **20**, 67-75.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Auricchio, S. *et al.* (2004). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1088-1096.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Alfonsi, G. *et al.* (2005). *J. agric. Food Chem.* **53**, 4379-4402.
- Diowksz, A., Koziol, G., Kordialik-Bogacka, E., Ambroziak, W., and Sucharzewska, D. (2006). *Proceedings of the 3rd International Symposium on Sourdough*, October 25-28, Bari, Italy.
- Drago, S., Asmar, R. E., D'Agate, C. *et al.* (2003). *Gastroenterology* **124**, A658.
- Ehrmann, M. A. and Vogel, R. F. (2005). *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 31-42.

- Ehrmann, M. A. Müller, M. R. A., and Vogel, R. F. (2003). *Int. J. Syst. Evolutionary Microbiol.* **53**, 7-13.
- Gallagher, E., Gormley, T. R., and Arendt, E. K. (2004). *Trends Food Sci. Technol.* **15**, 143-152.
- Gallo, G., De Angelis, M., McSweeney, P. L. H., Corbo, M. R., and Gobbetti, M. (2005). *Food Chem.* **9**, 535-544.
- Gänzle, M. G., Vermeulen, N., and Vogel, R. F. (2007). *Food Microbiol.* **24**, 128-138.
- Giovannini, C., Matarrese, P., Scazzocchio, B., Vari, R., D'Archivio, M., and Straface, E. (2003). *FEBS Lett.* **540**, 117-124.
- Giuliani, G. M., Benedusi, A., Di Cagno, R., De Angelis, M., Luisi, A., and Gobbetti, M. (2006). RM2006A000369.
- Gobbetti, M. (1998). *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 267-274.
- Gobbetti, M. and Corsetti, A. (1996). *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **203**, 82-87.
- Gobbetti, M. and Corsetti, A. (1997). *Food Microbiol.* **14**, 175-187.
- Gobbetti, M., Lavermicrocca, P., Minervini, F., De Angelis, M., and Corsetti, A. (2000). *J. Appl. Microbiol.* **88**, 317-324.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R. (2005). *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 57-69.
- Hammes, W. P. and Gänzle, M. G. (1998). *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1. London: Blackie Academic/Professional, pp.199-216.
- Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G.M., and Khosla, C. (2002). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, 996-1003.
- Höltzel, A., Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., and Jung, G. (2000). *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 2766-2768.
- Hoseney, C. (1994). *Principles of Cereals Science and Technology*, 2nd edn. St. Paul MN: American Association of Cereal Chemists.
- Katina, K., Arendt, E. H., Liukkonen, K. H., Autio, K., Flander, L., and Poutanen, K. (2005). *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 104-112.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K., and Langsrud, T. (2001). *Int. Dairy J.* **11**, 217-224.
- Kirschner, L. and Von Holy, A. (1989). *S. Afr. J. Sci.* **85**, 425-427.
- Korakli, M., Rossmann, A., Gänzle, G., and Vogel, R. F. (2001). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5194-5200.
- Lavermicrocca, P., Valerio, F., and Visconti, A. (2003). *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 634-640.
- Liukkonen, K. H., Katina, K., Wilhelmson, A. et al. (2003). *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 117-122.
- Lopez, H., Krspine, V., Guy, C., Messenger, A., Demigne, C., and Remesy, C. (2001). *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2657-2662.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Vacca, L. et al. (2001). *Am. J. Gastroenterol.* **96**, 150-156.
- Mazzarella, G., Maglio, M., Paparo, F. et al. (2005). *Gut* **52**, 57-62.
- Meroth, C. B., Hammes, W. P., and Hertel, C. (2004). *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 151-159.
- Molberg, O., Solheim Flaete, N., Jensen, T., Lundin, K. E., Arentz-Hansen, H., and Anderson, O. D. (2003). *Gastroenterology* **125**, 337-344.
- Moore, M. M. (2005). University College Cork Ireland.
- Müller, M. R. A., Ehrmann, M. A., and Vogel, R. F. (2000). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2127-2133.
- Müller, M. R. A., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M. A., and Vogel, R. F. (2001). *Food Microbiol.* **27**, 217-227.
- Östman, E., Nilsson, M., Liljeberg-Elmståhl, H., Molin, G., and Björck, I. (2002). *J. Cereal Sci.* **36**, 339-346.
- Picarelli, A., Di Tola, L., Sabbatella, M., Greco, L., Silano, R., and De Vincenzi, M. (1999). *J. Gastroenterol.* **34**, 1099-1102.
- Pyle, G. G., Paaso, B., Anderson, B. E. et al. (2005). *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 687-694.
- Rizzello, C.G., De Angelis, M., Di Cagno, R. et al. (2007). *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4499-4507.
- Röcken, W. and Voysey, P. A. (1995). *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 38S-48S.
- Ryan, L. A., Dal Bello, F., Renzetti, S., and Arendt, E.K. (2006). Meeting Abstract, San Francisco.
- Scheirlink, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A. et al. (2007). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 223-227.
- Schieberle, P. (1996). *Adv. Food Sci.* **18**, 237-244.
- Schnürer, J. and Magnusson, J. (2005). *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 70-78.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I. et al. (2002). *Science* **297**, 2275-2279.
- Shan, L., Marti, T., Sollid, L. M., Gray, G. M., and Khosla, C. (2004). *Biochem. J.* **383**, 311-318.
- Sikken, D. and Lousche, K. (2003). European Patent EP13611796.

- Sollid, L. M. and Khosla, C. (2005). *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 140-147.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C. *et al.* (2006). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, 460-468.
- Thiele, C., Gänzle, M. G. and Vogel, R. F. (2002). *Cereal Chem.* **79**, 45-51.
- Troncone, R., Mazzarella, G., Leone, N. *et al.* (1998). *Gut* **43**, 484-489.
- Valcheva, R., Korakli, M., Onno, B. *et al.* (2005). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 763-767.
- Valcheva, R., Ferchichi, M., Korakli, M. *et al.* (2006). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 587-591.
- Vancanneyt, M., Neysens, P., Dewachter, M. *et al.* (2005). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 615-620.
- Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitz, H., Vogel, R. F., and Gänzle, M. G. (2006). *J. Cereal Sci.* **43**, 137-143.
- Vogel, R. F., Bocker, G., Stolz, P. *et al.* (1994). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 223-229.
- Vogel, R. F., Knorr, R., Müller, M. R. A., Steudel, U., Gänzle, M. G., and Ehrmann, M. A. (1999). *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 403-411.
- Weiss, N. and Schillinger, U. (1984). *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 507-511.
- Wiese, B. G., Strohmar, W., Rainey, F. A., and Diekmann, H. (1996). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 449-453.
- Yan, F. and Polk, D. B. (2004). *Curr. Opin. Gastroenterol.* **20**, 565-571.

連絡先：瀬口 正晴 (Masaharu Seguchi)
Email: :gr228587@wf7.so-net.ne.jp