

酒もと饅頭に関する研究(7)

誌名	愛知県食品工業試験所年報
ISSN	03887758
著者	天野, 武雄 高橋, 伸幸
巻/号	28号
掲載ページ	p. 33-39
発行年月	1988年3月

酒酏饅頭に関する研究 (第7報)

酏中の乳酸菌の分離と同定

天野武雄・高橋伸幸*

酒酏饅頭の表皮を形成する発酵生地は、①アルコール香を伴ったもの、②①に酸味が附与されたもの、③①に酸味、酸臭が附与されたものに大別できる。しかもこれら発酵生地の香味は種酏に由来する微生物によって醸成されるものと思われる。このうち酵母については既に中里ら¹⁾、著者ら²⁾によって報告され、さらに発酵生地中で有用な酵母は生地中にエタノールを多く生成するものが良いことを述べた³⁾。しかし、酵母のみで発酵生地を製造した場合、いずれの酵母を用いても製品の風味が不足していた³⁾ことから複雑な香味を生成させるには他の微生物を生地中に増殖させることが必要であると考えられた。

本報では、生地中での乳酸菌の役割を研究する前に、いかなる乳酸菌が酏中存在するかを愛知県下の2社の酏について調査した。なお、酏中の乳酸菌は岡田ら⁴⁾によって調査され、*Lactobacillus batatus*が主要な乳酸菌であると報告されている。

実 験 方 法

1. 試料の採取および分離方法 A, B 2社の酏より乳酸菌を採取した。すなわち、酏を適宜滅菌生理食塩水で希釈し、その1 mlをシャーレにとり BCP 加 APT 培地を加えて30℃で2~3日間培養した。その際、カビ、酵母の併発を防ぐためカビサイジン⁵⁾を100 μ g/mlになるように加えた。培養後のBCP黄変コロニーを釣菌し、さらに2度同様に培養し乳酸菌を純化した。このようにしてA社の酏から8菌株(A-1~A-8)、B社の酏から4菌株(B-1~B-4)を無作為に抽出して以下の実験に供した。

2. 発酵生産物試験 グルコース5%, 酵母エキス(Difco)1%, バクトペプチン(Difco)1%, 無機塩溶液0.5% (V/V) (MgSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, FeSO₄·7H₂O, NaClをそれぞれ40mg, 2mg, 2mg, 2mgずつ1 ml中に含む水溶液), CaCO₃ 3%, pH 6.8の試験培地50 mlにあらかじめ APT 培地で30℃, 2日間培養した液5滴を加え、30℃で7日間培養した。

発酵生産物のグルコース、エタノールの分析は、培養液を0.65 μ メンブレンフィルターで濾過し、そ

*元愛知工大生

の一定量 (5 μ l) を日本分光 UVIDEC-100-III 型高速液体クロマトグラフ (カラム: Shodex Ionpack s-800p, カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 移動相: 水, 流速: 1 ml/min., 検出器: 紫外部230nm) で分析した。乳酸, 酢酸の分析は, 培養液に塩酸を加えて pH 2.0以下にして, さらに水で2倍量まで希釈したものを 0.65 μ メンブレンフィルターで濾過し, その一定量 (5 μ l) を島津 LC-3A 型高速液体クロマトグラフ (カラム: シマヅゲル SCR 101H, カラム温度: 55 $^{\circ}$ C, 移動相: pH 2.0過塩素酸水溶液, 流速: 0.5ml/min., 検出器: 紫外部210nm) で分析した。

3. 生育温度範囲試験 APT 培地 2 mlにあらかじめ前培養した乳酸菌を一滴加え, 各温度の恒温水槽で3日間培養後, 約20mlの純水で培養液をビーカーに移しフェノールフタレインを指示薬として 0.1NNaOH で滴定し, 滴定量から生育度を判定した。

4. 糖類発酵性試験 糖類22種類について発酵性を調べた。培地組成は酵母エキス (Difco) 0.5%, バクトペプチン (Difco) 0.5%, 無機塩溶液0.5% (V/V) で, 試験糖類はそれぞれ1%ずつ加えて pH 6.8に調整後, 115 $^{\circ}$ Cで15分間オートクレーブ処理した。培養は培地 2 mlに対して予め前培養した乳酸菌を一滴加えて30 $^{\circ}$ Cで3日間行った。発酵性の有無は0.1NNaOH による滴定値で判定した。

5. 生成乳酸の旋光性 岡田ら⁵⁾の酵素法に従って行った。

実験結果および考察

1. 乳酸菌の諸性質

第1表に乳酸菌の一般的性質を示した。12菌株の乳酸菌のうち1菌株のみ球菌で, ガスの発生が見られた。他の11菌株は総て短桿菌でガスの発生は見られなかった。

第2表に乳酸菌の生育温度範囲を示した。A-1株は10~35 $^{\circ}$ Cで生育し, 最適生育温度は15~20 $^{\circ}$ Cであった。A-2~A-8株の乳酸菌のうちA-3株を除いて15~40 $^{\circ}$ Cで生育した。これに対して, B-1株は15~50 $^{\circ}$ C以上, B-2, 3株は15~45 $^{\circ}$ C, B-4株は10~45 $^{\circ}$ Cと生育上限がA株よりいずれも高温であった。

発酵生産物試験の結果を第3表に示した。12菌株の乳酸菌のうちA-1株を除いて, 他の乳酸菌はグルコースから乳酸を90.8~97.3%生成し, ホモ発酵型であった。これに対して, A-1株はグルコースから乳酸を48.3%生成し, しかもエタノールを生成したことからヘテロ発酵型であった。

酵素法によって乳酸菌より生成された乳酸の旋光性を調べ, その結果を第4表に示した。A-1株はD型, A-2, A-5株はDL+D型, A-3~4株, A-6~8株はDL型, B-1~4はDL+L型であった。

糖の発酵性を第5表に示した。また, 第6表には標準菌株及び Bergey's manual⁶⁾の糖の発酵性を示した。

第1表 乳酸菌の一般的性質

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	B-1	B-2	B-3	B-4
形態	coccus	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
大きさ (μm)	0.8~1.0 ×	0.8~1.0 ×	0.8~1.0 ×	1.0~1.5 ×	1.0~1.2 ×	0.8~1.0 ×	1.0~1.2 ×	1.0~1.2 ×	0.4~0.6 ×	0.4~0.6 ×	0.4~0.6 ×	0.4~0.6 ×
	1.0~1.2	1.5~2.0	2.0~3.0	2.0~2.5	3.0~4.0	1.8~2.3	2.0~3.0	2.0~3.0	1.8~2.0	1.5~1.8	1.6~2.0	1.5~1.8
グラム染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ to NO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ガス発生	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
リトマスミルク:												
変色	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
凝固	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ペプトン化	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
生育状態*	混濁	混濁	沈降	沈降	沈降	混濁	沈降	沈降	沈降	沈降	沈降	混濁

* APT培地で30℃, 2日間培養後

第2表 乳酸菌の生育温度範囲

菌 株	培 養 温 度 (°C)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
A-1	-	+	++	++	+	+	+	-	-	-
A-2	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	-	-
A-3	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
A-4	-	-	++	++	+++	+++	+++	++	-	-
A-5	-	-	++	++	+++	+++	+++	++	-	-
A-6	-	-	+	++	++	+++	+++	++	-	-
A-7	-	-	++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
A-8	-	-	++	++	+++	+++	+++	++	-	-
B-1	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+
B-2	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
B-3	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
B-4	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	++	-

APT培地 2 ml, 30°C, 72hr培養後, フェノールフタレインを指示薬として0.1NNaOHで滴定, - : 0 ~ 0.25ml, + : 0.26 ~ 0.95ml, ++ : 0.96 ~ 1.65ml, +++ : 1.66ml以上

第3表 発酵生産物試験

菌 株	グルコース消費量	乳酸生成量	乳 酸 生 成 量	エタノール生成量	酢酸生成量
	mg/ml	mg/ml	グルコース消費量 %	mg/ml	mg/ml
A-1	51.3	24.8	48.3	12.2	0.9
A-2	51.3	47.3	92.2	0.0	0.8
A-3	51.3	48.3	94.2	0.0	1.3
A-4	51.3	46.6	90.8	0.0	1.0
A-5	51.3	48.7	94.9	0.0	1.1
A-6	51.3	48.5	94.5	0.0	1.2
A-7	50.3	47.1	93.6	0.0	0.5
A-8	50.3	46.7	92.8	0.0	0.5
B-1	51.3	48.1	93.8	0.0	0.7
B-2	51.3	49.6	96.7	0.0	0.8
B-3	51.3	49.9	97.3	0.0	0.8
B-4	51.3	49.2	95.9	0.0	0.7

2. 乳酸菌の同定

1の結果を基にして各乳酸菌を同定するとA-1株は球菌で、ヘテロ発酵型で、しかも生育適温が20°C附近にあり、生成乳酸もD型であり、糖の発酵性もほぼ *Leuconostoc mesenteroides* と一致することから同株と同定した。A-6株はホモ発酵型で、生成乳酸はDL型で、しかもRiboseを発酵し、その他の糖の発酵性も *Lactobacillus plantarum* と一致することから同株と同定した。B-1~3株は総てホモ発酵型で、生成乳酸はDL+L型でRiboseを発酵し、その他の糖の発酵性もほぼ *Lactobacillus*

第4表 乳酸菌より生成された乳酸の旋光性

菌株	5min, OD ₃₄₀		D/L (S _R)	D/L (B _R)*1	[E]*2	旋光性
	D-LDH	L-LDH				
A-1	0.264	0.003	88.00	2.72	-31.40	D
A-2	0.170	0.041	4.15	3.26	-0.27	DL+D
A-3	0.186	0.057	3.26	3.26	0.00	DL
A-4	0.206	0.080	2.58	2.68	0.04	DL
A-5	0.145	0.032	4.53	2.72	-0.67	DL+D
A-6	0.192	0.067	2.87	2.67	-0.08	DL
A-7	0.200	0.072	2.78	2.54	-0.09	DL
A-8	0.182	0.060	3.03	2.72	-0.11	DL
B-1	0.098	0.114	0.86	2.75	0.69	DL+L
B-2	0.103	0.137	0.75	2.75	0.73	DL+L
B-3	0.082	0.088	0.93	2.54	0.63	DL+L
B-4	0.074	0.126	0.59	2.68	0.78	DL+L

* 1 *Lactobacillus plantarum* IFO3070のLDH比* 2 $1 - S_R/B_R$

第5表 糖の発酵性

菌株 糖類	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	B-1	B-2	B-3	B-4
Arabinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Gluconae	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Melibiose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
α -Methyl-D-glucoside	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Salicin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

培地 2 ml, 30°C, 72hr培養後, フェノールフタレインを指示薬として0.1N NaOHで滴定, - : 0 ~ 0.25 ml, + : 0.26 ~ 0.95 ml, ++ : 0.96 ~ 1.65 ml, +++ : 1.66 ml以上

第6表 標準菌株の糖の発酵性

糖類	菌株 *							
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IAM 1046	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	<i>Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum</i> *	<i>L. casei</i> *	<i>L. casei</i> IFO 3425	
Arabinose	+	-	d	+	-	-	-	
Cellobiose	d	-	+	+	+	+	+	
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	
Galactose	+	-	+	+	+	+	+	
Gluconate		+	+	+	+	+	-	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	
Lactose	d	-	+	+	+	*	+	
Maltose	+	-	+	+	+	(d)	+	
Mannitol	d	-	+	+	+	+	+	
Mannose	+	-	+	+	+	+	+	
Melezitose		-	d	+	+	+	+	
Melibiose	d	-	+	+	-	-	-	
α -Methyl-D-glucoside		-		+			-	
Raffinose	d	-	+	+	-	-	-	
Rhamnose		-	-	-	-	*	+	
Ribose	+	-	+	+	+	+	+	
Salicin	d	-	+	+	+	+	+	
Starch		-		-			-	
Sorbitol		-	+	+	+	+	-	
Sucrose	+	+	+	+	+	(d)	-	
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	
Xylose	d	-	d	-	-	-	-	

* 文献 ⁶⁾

casei と一致することから同株と同定した。

しかしながら A-2~5, A-7, 8, B-4 の各菌株は Bergey's manual ⁶⁾ には完全に該当するものが見られなかったが, A-2~5, A-7, 8 はホモ発酵型で DL 型あるいは DL+D 型の乳酸を生成すること及び比較的糖の発酵性が *Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum* に近いことから, この乳酸菌の類縁菌と見られる。また, B-4 株についてはホモ発酵型で DL+L 型乳酸を生成し, しかも糖の発酵性が類似したものは Bergey's manual ⁶⁾ の中には見られなかった。

要 約

酒酩饅頭の酩から無作為に12菌株の乳酸菌を分離し同定した。同定できた乳酸菌は, *Leuconostoc*

mesenteroides 1 菌株, *Lactobacillus plantarum* 1 菌株, *Lactobacillus casei* 3 菌株であった。また, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* の類縁菌として 6 菌株, Bergy's manual 記載のいずれの乳酸菌にも該当しないもの 1 菌株であった。

本研究を行うに際して, 東京農大岡田先生から乳酸菌同定マニュアルを頂きました。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) 中里ら：東京農業大学創立90周年記念論文集, p.61 (1981)
- 2) 天野ら：日食工誌, 32, 906 (1985)
- 3) 天野ら：愛知食品工試年報, 26, 48 (1985)
- 4) 岡田ら：発酵工学, 60, 403 (1982)
- 5) S. Okada et al. : Agric. Biol. Chem., 42, 1781 (1978)
- 6) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. p.510, p.576. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)