

牛乳及び乳製品中に存在する乳酸菌について

今村 経明・片岡 啓

On the lactic acid bacteria survived in milk and milk products.

Tsuneaki IMAMURA and Kei KATAOKA

Investigation of various lactic acid bacteria in milk products and discovery of useful strains are significant to dairy industry. For this reason, isolation of lactic acid bacteria from raw milk, cheese, butter and dried milk has been done. Each sample used in these experiments were obtained from different milk plants and groceries. Methods used for the examination of isolated strains were titratable acidity for acid producing activity, formol titration for proteolytic activity, creatine test or PRILL-HAMMER's method for aroma producing activity and skimmilk-lime-agar method for isolation, respectively.

Thus, the results obtained were summarised as follows:

Almost of strains isolated from raw milk (R-) were cocci and their characters were resemble to *Str. lactis*. The strains obtained from cheese (C-) were distinguished from the above ones owing to the changes of bacterial distribution in cheese during long ripening period. In the case of dried milks (D-), thermoduric bacteria were predominant as the others had been destructed by heat treatment of spray dring. The strains from butter (B-) were also distinguished from those from raw milk, owing to the high concentration of salt (about 18% in aqueous solution). As for the proteolytic and acid producing activities, more active strains were not discovered, but more aroma producing bacteria were obtained from cheese (C-2), dried milk (D-1, D-5) and butter (B-11). Practical value of these strains were not yet examined. Proteolytic action of lactic acid bacteria were influenced with the acidity of medium. Then, the proteolysis in skimmilk were accerelated by addition of CaCO_3 to the medium.

乳糖を醗酵して乳酸を生成する細菌を乳酸菌 (lactic acid bacteria) と呼んでいる。これを酪農に使用する目的から酸生成菌 (acid producing bacteria) と香気生成菌 (Aroma producing bacteria) に分けている¹⁾。前者はチーズ及びヨーグルト用スターターに用いられるもので、その代表的な菌種は *Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus* 及び *Lact. yoghurti* 等である。後者はバター用スターターの中に酸生成菌と共棲して存在するもので、*Leuconostoc citrovorum* 及び *Leuc. dextranicum* 等の *hetero fermentative* のものである。生成される香気の中、著明なものはダイアセチル (diacetyl) である²⁾。チーズやヨーグルトの場合には凝固を容易ならしめるために酸生成力を持つ菌が要求されるが³⁾、菌の蛋白分解性は同時に製品の風味に関係してくる⁴⁾。従つて酪農用乳酸菌を使う目的は、その酸生成力、ダイアセチル生産力及び蛋白分解力の何れかを使用して牛乳中の成分を醗酵することにある。

米国で生産されるチーズその他の乳製品が欧米の先進国のものに比肩し得る様になつたのも乳酸菌の研究即ちスターターの科学の確立に負うところが大きい。我々は牛乳及び乳製品中に存在する乳酸菌の種類とその性質を調べることによつて品質との関係に一知見を得ると共に、有用な新菌株の発見を意図して以下の実験を遂行した。

I. 実験方法

1. 試料

分離のための試料には生乳 (raw milk) 7 点, 粉乳 (dried milk) 2 種 4 点, チーズ (cheese) 1 種 3 点, バター (butter) 2 種 5 点を用いた. 分離した菌株は整理上, これら分離源に基づいてそれぞれ R-, D-, C-, B-, なる符号を附した.

2. 乳酸菌の分離法.

a) 培養基: 菌の種類によつて培養基の選択性が異なるため, 組成を異にする次の 3 種の培養基を用いた⁵⁾.

脱脂乳白亜寒天……肉エキス 10 g, ペプトン 10 g, 食塩 5 g, 脱脂粉乳 10 g, 石灰 20 g, 寒天 20 g を水 1 l に溶解したもの.

酵母白亜寒天……乾燥酵母 3 g の抽出液, ペプトン 10 g, 葡萄糖 30 g, 石灰 20 g を水 1 l に溶解したもの.

麴白亜寒天……麴汁 1 l に石灰 20 g 及び寒天 20 g を添加したもの.

b) 培養: 生乳はこれを空隙のない様に試験管内に封じて数日間集積培養したものを上記の培地に平板培養した. その他のものについては, 1~2 回リトマスミルクに淘汰培養した後平板培養を行つた. かびの発生を防ぐため主に 30° 及び 37° で培養し, 生じた Pin head colony を滅菌脱脂乳に移植して試験に供した.

3. 分離菌の試験.

a) 培養基: 間歇滅菌した脱脂乳を基礎培地とした.

b) 菌形: 脱脂乳培地を中和した後, メチレンブルーで染色して鏡検した.

c) 蛋白分解性: 分解生産物たるアミノ酸を WALKER 法で測定した. 培養後の脱脂乳中に含まれるアミノ態窒素をホルモール滴定し, 牛乳 10 cc に対するアミノ態窒素の mg 数で表わした⁶⁾.

d) 芳香生産力: 脱脂乳培養をクレアチンテスト (creatin test)⁷⁾ によつて検定し, 陽性を示したものについて PRILL-HAMMER 法⁸⁾ によつて diacetyl の生産量を比色定量し, ppm で表わした.

クレアチンテストとは diacetyl 及びその母体である acetoin の簡単な定性試験法であり, その概要は試料 2.5 cc を小型試験管に入れ (creatin を約 5 mg 加え更に 40% 苛性ソーダ溶液 2.5 cc を加え振盪すれば陽性のものは数分後に液の表面に赤色の層が現われる. また Prill-Hammer 法とは, 試料 50~100 g (pH 約 6.5) に対し試薬 A 1 cc を加え炭酸ガス中で水蒸気蒸溜を行い, 得たる溜液 11 cc を 85°C で 1 時間加熱した後試薬 B を 1 cc 加え, 5 分後試薬 C 0.3 cc, D 2.2 cc 及び E 0.2 cc を加える. 斯くして出来た ammono ferrous dimethyl glyoximate を S. 53 フィルター, 10 mm キュベットを用いて比色定量する. 各試薬は, 次の様である.

A. 醋酸ナトリウム 70 g を 200 cc の蒸溜水に溶解したものと, ヒドロキシルアミン 35 g を蒸溜水に溶かして 800 cc にしたものを 1:4 に混合したもの.

B. 第一磷酸カリ 144 g 及びアセトン 200 cc を水に溶かして 1 l とする.

C. アンモニア水. (比重 0.90)

D. ロッセル塩 90 g を 35°C に於て 50 cc の蒸溜水に溶かす.

E. 硫酸第一鉄 5 g を 1% 硫酸溶液 100 cc に溶かす.

e) 生酸力: 脱脂乳培養 10 cc を 0.1 N 苛性ソーダで滴定し, 得たる結果を乳酸%として表わした⁹⁾.

f) 適温試験: 24 時間培養後に生成される乳酸量を比較し, 生酸量の多い温度を適温とした.

g) 牛乳凝固力: 一定時間後の牛乳を観察し, 凝固の有無を+-で表わした.

II. 実験結果及び考察

1. 菌形

Table 1 に示す如く, 分離菌株 65 株中 61 株が球菌であり桿菌は僅か 4 株に過ぎない. 生乳中に存在する乳酸菌の 90% 以上が球菌であることは多くの研究者によつて認められている¹¹⁾. しかし長期間醗酵するチーズから桿菌が分離されないのは, 使用した種類がプロセスであつたこと及

Table 1. Type, Proteolytic Activity and Acid Producing Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated From Milk and Milk Products.

number	type	after incubation for 1 week		number	type	after incubation for 1 week	
		amino-N(mg)	lactic acid(%)			amino-N(mg)	lactic acid(%)
R-1	sphere	0	0.67	C-1	sphere	0	0.25
2	sphere	0	0.25	2	sphere	0	0.26
3	sphere	0.77	0.52	3	sphere	0	0.25
4	sphere	0	0.54	4	sphere	0	0.26
5	sphere	0	0.32	5	sphere	0	0.25
6	sphere	0	0.29	6	sphere	0	0.26
7	sphere	0	0.22	7	sphere	0	0.27
8	sphere	0	0.52	8	sphere	0	0.26
9	sphere	0	0.28	9	sphere	0	0.74
10	sphere	0	0.49	10	sphere	0	0.27
11	sphere	0	0.50	11	sphere	0	0.28
12	sphere	0	0.23	12	sphere	0	0.27
13	sphere	0	0.34	B-1	sphere	0	0.71
14	sphere	0	0.65	2	sphere	0	0.69
15	sphere	0	0.24	3	sphere	0	0.68
16	sphere	0	0.69	4	sphere	0	0.71
17	sphere	0	0.16	5	sphere	0	0.69
18	sphere	0	0.28	6	sphere	0	0.71
19	sphere	0	0.10	7	sphere	0	0.68
20	sphere	0	0.19	8	sphere	0	0.65
21	sphere	0	0.48	9	sphere	0	0.66
22	sphere	0.85	0.51	10	sphere	0	0.63
23	sphere	0.70	0.52	11	sphere	0.45	0.37
24	sphere	0	0.35	12	sphere	0	0.40
25	sphere	0	0.15	D-1	sphere	0.56	0.44
26	sphere	0	0.08	2	sphere	0.56	0.37
27	sphere	0	0.31	3	sphere	0	0.33
28	sphere	0.70	0.14	4	sphere	0.70	0.43
29	sphere	0.70	0.12	5	sphere	0	0.51
30	sphere	0.70	0.12	6	sphere	0.63	0.27
101	rod	0	0.49	7	sphere	0.42	0.46
102	rod	0	0.24	<i>Str. lactis</i>	sphere	0.28	0.66
103	rod	0	0.56	<i>Lact. bulgaricus</i>	rod	0.70	0.08
104	rod	0	0.18				

び実験操作上平板表面の pin head colony を撰択することが多かつたためと思われる。バターは脂肪を主体とする食品である上に高濃度の食塩（水溶液として15~20%になる）のために細菌の生育に適していない。しかも我が国では醗酵バターを作っていないので、牛乳中に本来存在する球菌が優位を占めていると思われる。

2. 生酸力及び蛋白分解性

代表的酪農用乳酸菌の *Str. lactis* 及び *Lact. bulgaricus* に比し、特に顕著な生酸力を持つ菌株を分離出来なかつた。バターから分離された菌は比較的生酸力の強いものが多かつたが、チーズからのものには殆んど見当らなかつた。チーズ製造に用いられる乳酸菌は生酸力の強いことが必要条件であるが、熟成中に起る成分変化に伴い生存する菌の分布が変化してきたためと思われる。例えば製造直後は葡萄糖を消費する球菌が盛んに生育しているが、その後はガラクトースを消費する菌が優勢を占めることが報告されている¹²⁾。即ち乳糖を構成する葡萄糖とガラクトースの中、葡萄糖の方が早く消費されてしまう。従つて熟成の段階によつて乳酸菌の分布が異り、この結果のみでチーズ中の乳酸菌の分布を論議することは出来ない。しかし粉乳では乾燥熱で淘汰される結果になるため、残存する菌の性質が比較的類似している。バターの場合にも耐熱性の弱い菌は生存出来なくなるとと思われる。

蛋白分解性についても特異な菌株を発見出来なかつた。一般に桿菌は球菌より蛋白分解力が強い。このことは旨味の発生する熟成後期のチーズ中に比較的桿菌が見られることにも関連する¹⁰⁾。しかし乳酸菌の発育適温は30°~40°であるのにチーズの熟成は比較的低温（10°C以下）で行われる。従つてこの様な低温で長期間培養した場合について観察したところ Table 2 に示す結果を得た。即ち10°と30°に於ける最終生酸量及び蛋白分解度に差が認められない。

生酸量に関しては発育適温よりも若干低い温度で培養した方が多くなるという報告もある¹⁴⁾。この実験に於ては蛋白分解度にこの傾向が認められた。

Table 2. Proteolytic Activity and Acid Producing Activity of Isolated Lactic Acid Bacteria.

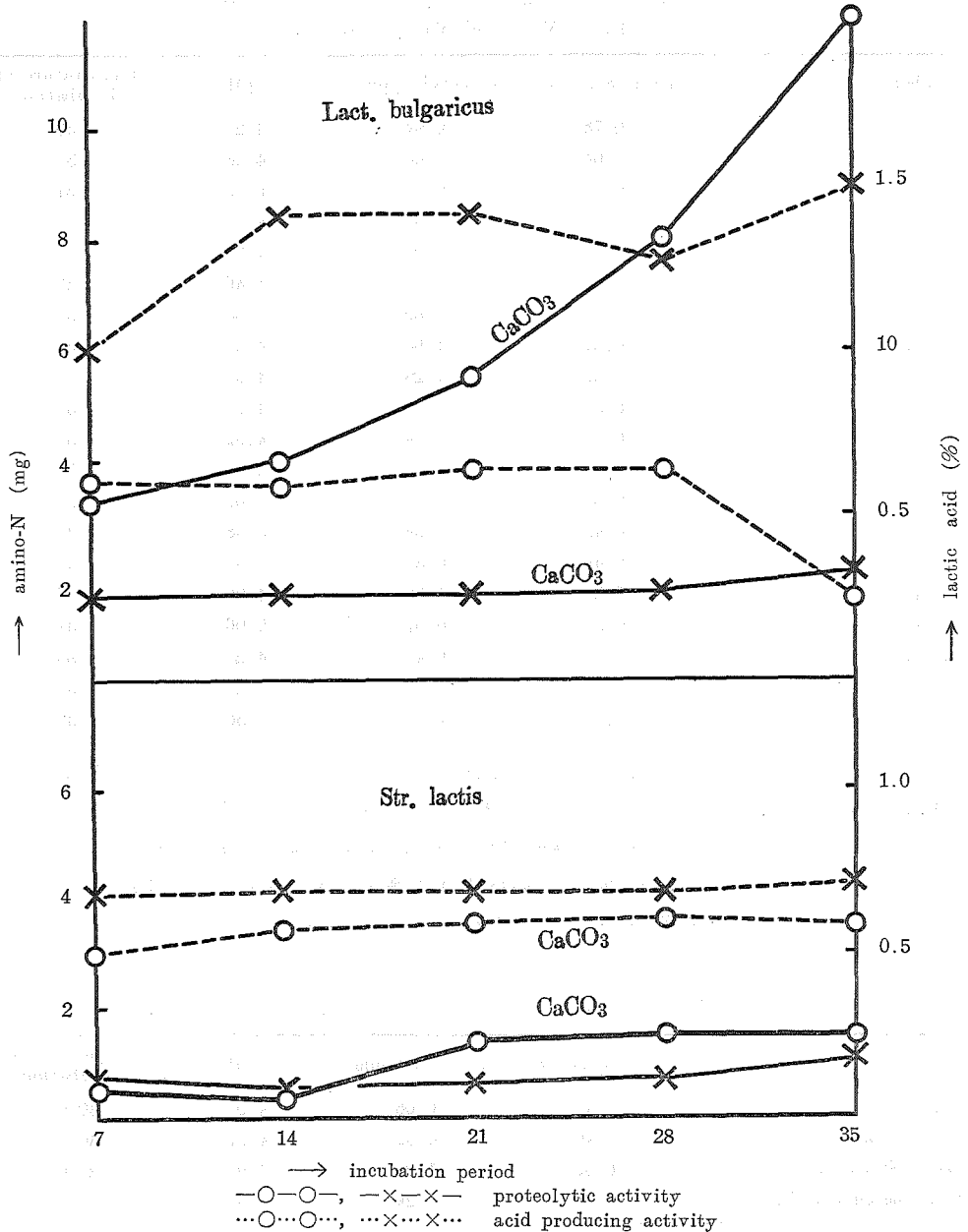
number	amino-N (mg)		lactic acid (%)		number	amino-N (mg)		lactic acid (%)	
	10°C	30°C	10°C	30°C		10°C	30°C	10°C	30°C
R-1	0.40	0.40	0.55	0.69	C-5	0.16	0.08	0.42	0.43
11	0.00	0.00	0.50	0.52	6	0.16	0.08	0.48	0.43
14	0.48	0.64	0.52	0.49	7	0.16	0.08	0.44	0.51
D-1	0.80	0.72	0.48	0.50	8	0.16	0.08	0.45	0.52
4	0.10	0.08	0.46	0.47	9	0.36	0.08	0.46	0.46
5	0.96	0.88	0.49	0.50	10	0.08	0.08	0.47	0.46
7	0.12	0.96	0.49	0.51	12	0.32	0.16	0.50	0.49
C-2	0.40	0.32	0.51	0.46	B-7	0.40	0.40	0.53	0.52
3	0.24	0.16	0.47	0.42	11	0.08	0.00	0.43	0.49
4	0.24	0.00	0.49	0.43	12	0.00	0.00	0.42	0.48

プロテアーゼは概してアルカリ性に於いて活性度が高い。従つて生成された乳酸によつて培地が酸性に傾く場合には、その活性が抑制されると思われる¹¹⁾。特に *Lact. bulgaricus* の様に生酸力の旺盛なものに顕著である。そこで培地に CaCO₃ を添加して pH の低下を防ぎ乍ら蛋白分解度を調べたところ Fig. 1 の如き結果を得た。

CaCO₃ 添加により蛋白分解度は著しく増大するとともに酸度の上昇が抑制される。特に培養末期に酸度の減少を示すのは、蛋白分解物の蓄積によつてアルカリ性に傾くためであろう。この様に乳糖分解により生成する乳酸と蛋白分解により生成するアンモニアその他塩基によつて pH が変動すると考えられる。両者が平衡して決定される pH が乳酸菌の代謝即ち醗酵の状態、乳製品の品質に影響して来る。

チーズの場合には pH 5~6 の微酸性のときに正常な醗酵が進められる。

Fig. 1. Effect of CaCO₃ on the proteolytic activity of *Lact. bulgaricus* and *Str. lactis*.



3. 香気生産性

乳製品の香気成分は解明されていない。しかし diacetyl がバターの主要な香気成分であることには異論がない²⁾。このものはクエン酸が分解されて出来るものであるが、acetyl methyl carbinol (別名 acetoin) に変り易く、溶液中では両者が平衡関係を保っている。acetoin は香気には関係しないともいわれている。ところがクリアテンテストでは両者を同時に検出することになるので、別に diacetyl を定量して比較することにした。

分離菌株について行つたクリアテンテスト及び diacetyl 定量の結果は Table 3 に示す通りである。

Table 3. Aroma Producing Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated From Milk and Milk Products.

number	creatine test	lactic acid (%)	diacetyl (ppm)	pH	temperature of incubation
R-1	±	0.78	0.94	4.27	30
11	-	0.64	0.66	4.58	37
14	-	0.36	0.65	5.72	37
D-1	+	0.72	1.98	4.38	37
4	++	0.53	1.27	4.94	37
5	++	0.73	1.64	4.46	37
7	+	0.73	0.82	4.58	37
C-2	+	0.57	1.60	4.51	37
3	+	0.52	1.29	4.94	37
4	+	0.52	1.10	4.99	37
5	++	0.48	1.14	4.99	37
6	+	0.51	1.13	5.01	37
7	++	0.50	0.90	5.09	37
8	++	0.49	0.98	5.08	37
9	++	0.49	0.89	5.03	37
10	++	0.56	1.06	4.90	37
12	++	0.51	0.97	5.06	37
B-7	-	0.93	0.41	4.25	30
11	+	0.44	1.79	5.25	30
12	+	0.43	2.03	5.30	30

これを現在当研究室に保管している乳酸菌に比較すると (Table 4 参照)、芳香生産性が強い。

従来 *Str. lactis* は酸生成菌と考えているが著者は曾て可成りの diacetyl をも生産することを認め¹²⁾。香気生成菌である *Leuc. citrovorum* は酸生成力は極めて弱く、加うるに *Str. lactis* 等と共棲させないと牛乳に生育しない。従つて両方の性質を備えた菌が発見されれば製造工程が極めて容易になる。D-1, D-5, E-2, B-11 等はこれに近いものと思われるが、実用性に関しては多くの製造実験に俟たなければならない。

Table 4. Diacetyl Production by Various Lactic Acid Bacteria.

	lactic acid (%)	diacetyl (ppm)	pH	temperature of incubation
<i>Str. lactis</i>	0.49	0.66	4.90	30°C
<i>Str. cremoris</i>	0.46	0.53	4.97	30°C
<i>Leuc. citrovorum</i>	0.52	1.25	4.97	25°C
<i>Leuc. paradesulfuricum</i>	0.28	0.29	5.92	25°C

4. 発育適温及び牛乳凝固試験

酪農用乳酸菌の発育適温は 25~40°C の範囲にあり概して高温性のものが多い。即ち *Str. thermophilus*, *L. johurti* は 45~50°C; *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* は 35~40°C; *Str. lactis*, *Str. cremoris* は 30~35°C; *Leuc. citrovorum*, *Leuc. dextranicum* は 25~30°C である¹³⁾。分離菌株を同定する一助とするため、各菌株の発育適温を調べた。一定量の脱脂乳培地に生育させたとき生成する乳酸量を以つて判定したところ、30° を op-temp とするものが多く、粉乳から分離した

Table 5. Effects of incubation temperature on the acid producing activity of isolated strains.

number	coagulation of milk	incubation temp. as				number	coagulation of milk	incubation temp. as			
		25°	30°	35°	40°			25°	30°	35°	40°
R-1	-	0.50	0.50	0.44	-	D-1	+	0.11	0.33	0.40	0.45
2	+	0.37	0.47	0.41	-	2	+	0.18	0.36	0.39	0.49
3	+	0.19	0.32	0.31	-	3	+	0.17	0.11	0.14	0.24
4	+	0.28	0.41	0.17	-	4	+	0.04	0.09	0.12	0.31
5	+	0.32	0.47	0.26	-	5	+	0.18	0.36	0.50	0.56
6	+	0.53	0.61	0.48	-	6	+	0.18	0.35	0.42	0.55
7	+	0.20	0.31	0.26	-	7	+	0.16	0.35	0.42	0.48
8	+	0.54	0.61	0.48	-	C-1	-	-	0.11	0.17	0.13
9	+	0.53	0.58	0.47	-	2	-	-	0.10	0.15	0.12
10	+	0.30	0.32	0.31	-	3	-	-	0.11	0.18	0.12
11	+	0.30	0.37	0.43	-	4	-	-	0.11	0.16	0.14
12	+	0.50	0.56	0.45	-	5	-	-	0.10	0.18	0.11
13	+	0.01	0.32	0.12	-	6	-	-	0.10	0.17	0.13
14	+	0.60	0.59	0.50	-	7	-	-	0.15	0.16	0.12
15	+	0.24	0.31	0.32	-	8	-	-	0.12	0.17	0.15
16	-	0.52	0.58	0.54	-	9	-	-	0.12	0.18	0.13
17	+	0.24	0.33	0.32	-	10	-	-	0.11	0.17	0.14
18	+	0.28	0.50	0.40	-	11	-	-	0.10	0.17	0.12
19	+	0.58	0.67	0.47	-	12	-	-	0.61	0.17	0.12
20	+	0.37	0.46	0.32	-	B-1	+	0.47	0.59	0.51	-
21	+	0.54	0.56	0.46	-	2	+	0.47	0.61	0.54	-
22	+	0.60	0.68	0.49	-	3	+	0.41	0.61	0.54	-
23	+	0.54	0.60	0.48	-	4	+	0.49	0.59	0.55	-
24	+	0.55	0.61	0.48	-	5	+	0.49	0.62	0.51	-
25	-	0.15	0.05	0.09	-	6	+	0.47	0.61	0.52	-
26	+	0.09	0.14	0.31	-	7	+	0.48	0.62	0.50	-
27	+	0.05	0.13	0.28	-	8	+	0.51	0.61	0.51	-
28	+	0.19	0.27	0.31	-	9	+	0.46	0.62	0.55	-
29	+	0.18	0.26	0.36	-	10	+	0.52	0.59	0.54	-
30	+	0.19	0.25	0.29	-	11	±	0.06	0.19	0.19	0.10
101	+	0.00	0.03	0.50	-	12	+	0.05	0.19	0.21	0.20
102	+	0.00	0.03	0.30	-						
103	+	0.00	0.02	0.37	-						
104	+	0.00	0.14	0.35	-						

(numbers in table give % of lactic acid in medium)

菌株は更に高温性のものが多かつた。(Table 5 参照). 生乳から分離した球菌は *Str. lactis* 類似のものと思像される. 粉乳中に高温細菌が多いのは spray drying の際の熱により低温細菌が死滅するためであろう.

既に述べた如くチーズの酸酵は低温で行われる. その理由の一つは雑菌の汚染を防ぐことにある. 従つて低温でも活力旺盛な菌の存在が望ましいのであるが, その様な菌は発見出来なかつた. また牛乳を凝固するためには酸度を適当に高めるか凝乳酵素を用いるかによつていた. しかし凝乳酵素を生産する菌株があれば酸度が低くとも牛乳を凝固させる筈である. この様な菌を見出すことは出来なかつたが, 実用上特異な菌であると思うので今後も努力を続けたいと思う.

III. 結 論 及 び 要 約

1. 我が国に於て生産される牛乳及び乳製品の一部について乳酸菌の分布を調べたところ *Str. lactis* 類似の球菌が大部分であつた. プロセスチーズでは長い熟成期間中に原料乳中の乳酸菌やスターターに用いた乳酸菌とは異つた菌の分布を示す様になつている. 粉乳の場合には製造工程に spray drying があるために高温性菌が多いことが認められた. パター中の乳酸菌も原料乳中の分布とは趣を異にしているが, これは乳酸菌にとつて栄養的に偏つていることや食塩濃度が高いことが原因かも知れない.

2. 在来のものに比し優秀な酸生成または蛋白分解性を示す菌を分離出来なかつた. 蛋白分解性に関しては培地の pH が影響するところ大であつて, 乳糖分解により生成する乳酸と蛋白分解により生成する塩基性化合物との相関関係によつて乳酸菌の酸酵状態が変化する. このことは特にチーズの場合に重要であると思われる. 即ち乳酸生成が増大すれば酸性に傾いて旨味物質の生成が遅れ, 蛋白分解が盛んになれば乳酸菌の生育が抑制されて腐敗し易くなる. 従つて平衡状態如何によつて製品の品質が支配される.

3. diacetyl 量からみて優秀な香気生成菌を数株発見出来た. これ等の菌は香気生成に秀れているのみでなく, 生酸力も顕著である. 従つて単独使用出来るスターターとして実用化し得る可能性がある. 在来の香気生成菌が酸生成菌と共棲させる必要のある点を補つている.

文 献

- 1) 友田宣孝編 (1956): 微生物工学講座, 8巻, 共立出版, 初版, 332.
- 2) J. G. DAVIS (1955): A dictionary of dairying, 388.
- 3) 佐々木林治郎, 前野正久 (1952): 畜産物の科学, 3 輯, 37~60.
- 4) 伊藤安 (1951): チーズ, 明文堂, 増訂版, 203.
- 5) 小島正秋, 斎藤道雄 (1946): 乳と乳製品の細菌学, 地球出版, 3 版, 270~273.
- 6) 赤堀四郎編 (1954): 蛋白質化学, 1巻, 共立出版, 初版, 170~172.
- 7) 小沢康郎 (1953): 酪農用乳酸菌の研究, 農技研報告, G. No. 5, 23~29.
- 8) E. A. PRILL and B. W. HAMMER (1938): A colorimetric method for the microdetermination of diacetyl. Iowa. St. Co. Sci. Vol. 12, 835~95.
- 9) 東大農芸化学教室編 (1952): 実験農芸化学, 下巻, 朝倉書店, 初版, 602.
- 10) 佐々木林治郎, 中江利孝 (1956): 牛乳から分離した乳酸菌の蛋白分解力について, 日本畜産学会報, 27巻, 別号, 9~10.
- 11) 小沢康郎, 見坊寛 (1953): 乳酸菌の蛋白分解力について, 農技研報告, G. No. 6, 51~54.
- 12) 佐々木林治郎, 津郷友吉, 今村経明, 村井宗昭 (1954): 乳酸菌による diacetyl 生産について, 日畜会報, 24巻, 4号, 176~179.
- 13) 友田宣孝編 (1956): 微生物工学講座, 8巻, 共立出版, 初版, 233.