ネパール産餅麴ムルチャの乳酸菌フロラ

小 泉 幸 道・村 清 司・内 村 泰

(東京農業大学農学部)

平成 8 年 7 月 4 日 受理

Floras of Lactic Acid Bacteria in Chinese Starter, “Murcha” from Nepal

Studies on the Microorganisms in Chinese Starter from Nepal (Part 2)

Yukimichi KOIZUMI, Kiyoshi MURA and Tai UCHIMURA

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka,
Setagaya-ku, Tokyo 156)

Dominant lactic acid bacteria in 26 kinds of Chinese starter “Murcha” from 25 different parts of Kingdom of Nepal were investigated. Lactic acid bacteria were isolated from all 26 of Kinds of “Murcha”, each of which had about 10^3 colony forming units of lactic acid bacteria per gram “Murcha”. *Pediococcus* accounted for 92% of 248 lactic acid bacteria isolated and were identified as *Pediococcus pentosaceus*. It showed homolatic fermentation with formation of DL-lactic acid. Other lactic acid bacteria were identified as *Lactobacillus plantarum* in 5 kinds of “Murcha”, *Lactobacillus brevis* in 2 kinds, and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in one kind. The results indicate that dominant lactic acid bacteria in “Murcha” from Nepal is *Pediococcus pentosaceus* which would be responsible for lactic acid formation in “Murcha”. The findings support the results of our previous studies on lactic acid bacteria in Chinese starters, “Bubod” from Philipines, “Ragi” from Indonesia, “Luck pang” from Thailand and “Chang poo” from Bhutan.

Key words : 乳酸菌・ムルチャ・ネパール

緒 言

筆者の一人である内村は、東南アジア諸国での米酒醸造に使用される餅麴として、フィリピンのブボッド (Bubod)、インドネシアのラギ (Ragi)、タイのluckパン (Luck pang) ブータンのチャンポー (Chang poo) 等の微生物相について検討を加え既に報告^{1~3)}した。その中で餅麴中に生息する主要な乳酸菌は、四連球菌である *Pediococcus pentosaceus* であり、*Lactobacillus* などの桿菌は少ないことを述べている。この *P. pentosaceus* が高い頻度で分離される原因は、天然開放で製造されている餅麴の中で、増殖速度の速い球菌が先に増殖すること、また桿菌に比べ得られた球菌は乾燥に対する耐性が高いことから、*P. pentosaceus* が一つの相の中で純粋分離の状態では濃縮されたのではないかと考察している。

ネパール産餅麴の微生物に関する研究 (第2報)

ネパールにおいても、醸造酒や蒸留酒製造には餅麴であるムルチャが使われている。この山岳地域の餅麴とフィリピンやインドネシアのように、大陸から海によって隔てられた地域との餅麴の微生物相についても興味を持たれることから、前報⁴⁾において筆者らが収集したネパールの餅麴中に棲息する酵母と糸状菌について調べたところ、主要酵母は *Saccharomycopsis fibuligera* であり、主要糸状菌は *Rhizopus*, *Absidia* および *Mucor* であることを報告した。本報では前報⁴⁾に続き、乳酸菌の分離と同定を行い、他国の餅麴の微生物と比較することを目的とした。

実 験 方 法

1. 供試試料

前報⁴⁾と同様に、ネパールの全国 25 地点から収集したムルチャ 26 点を供試した。

2. 乳酸菌の分離

試料約1gを粉碎後、滅菌生理食塩水(0.85% NaCl) 9mlに懸濁し順次希釈した。GYP 白亜寒天培地に混釈法で接種し、30°Cで3日間平板培養を行った。培養後、クリアゾーンを形成したコロニーから生酸菌を釣菌した。釣菌は一試料から約10株を目安に行った。分離菌株はさらに同培地を用いて単コロニー分離を3回繰り返して、供試菌株を純粋分離した。

3. 乳酸菌の同定

乳酸菌の同定実験法は、乳酸菌実験マニュアル⁵⁾に従った。形態観察の培地組成は、ブドウ糖 1.0%、酵母エキス(Difco) 1.0%、ポリペプトン 0.5%、酢酸ナトリウム 0.2%、Salts solution (MgSO₄·7H₂O 40mg/ml, MnSO₄·4H₂O 2mg/ml, FeSO₄·7H₂O 2mg/ml, NaCl 2mg/ml) 0.5%、Tween 80 solution (2.5mg/ml) 1.0%、pH 6.8とし、30°Cで2日間培養後、顕微鏡観察を行った。初発 pH 試験は、pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 に調整した GYP 培地を作成し、30°Cで3日間培養して判定した。生育温度試験は、形態観察と同組成の培地で前培養後、その培養液を生理食塩水で100倍に希釈して、一滴を同組成の培地に接種し、10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°Cで各々5日間培養し判定した。耐塩性試験は GYP 培地に、食塩 4.0, 6.5, 7.5, 10.0, 15.0% を添加して調製し、前培養液を一滴接種し、30°Cで3日間培養して判定した。グラム染色、カタラーゼ試験、ゼラチン液化試験は、形態観察と同組成の培地で供試菌株を培養後、各々の試験に供した。硝酸塩の還元試験は、0.1% KNO₃ を含有するポリペプトン水培地を用いて 30°Cで5日間培養後、NO₂-検出用試薬を加えて、色の変化を観察した。リトマスミルク試験は、リトマスミルク培地(スキムミルク 1.0%、リトマス溶液 0.1%、pH 6.8)に接種し、30°Cで5日間培養して、脱色、凝固、液化について判定した。グルコースからのガス発生試験は、形態観察と同組成の培地であるが、ブドウ糖の濃度を2.0%とし、30°Cで3日間培養後、ダーラム管内のガス発生の有無を観察した。次にアルコール定量によるホモおよびヘテロ型発酵形式決定試験は、供試菌株を3日間培養後、エ

タノール定量試薬(Fキット/ペーリンガー・マンハイム山之内(株))を用いて試験を行い判定した。乳酸旋光性試験は、形態観察と同組成の培地で供試菌株を培養するが、酢酸ナトリウムは培地から除いて、30°Cで5日間培養後、菌体を除去し、活性炭で処理を行い濃縮乾固した液に、蒸留水を添加して乳酸水溶液とした。水溶液の一定量に NAD 溶液を添加し、L-LDH 溶液又は D-LDH 溶液を一定量添加して、L, D の OD₃₄₀ 値を各々求めた。同時に標準 DL-乳酸溶液も同様の反応を行い、OD 値を求めた。偏り率の値から判定基準により、生成乳酸の旋光性を決定した。糖類発酵性試験は、形態観察と同組成の培地を用い、各糖の濃度を1.0%として添加し、30°Cで5日間培養後、滴定法により生酸性試験を行った。評価はグルコースの発酵性を基準として、その15%以下の糖は発酵性がないものと判定した。供試糖類は、アラビノース、セロビオース、フルクトース、ガラクトース、グルコン酸塩、グルコース、ラクトース、マルトース、マンニトール、マンノース、メレジトース、メリビオース、ラフィノース、ラムノース、リボース、サリシン、ソルビトール、デンプン、シュクロース、トレハロース、キシロースの21種類である。

菌種の同定⁶⁾は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2⁶⁻⁷⁾の記載に従った。

結果および考察

1. 乳酸菌の分離および供試菌株の選択

収集したマルチ 26 点より乳酸菌の分離を行った。各試料ともその生菌数は 10⁶/g 前後であり、乳酸菌はすべての試料に生存しており、得られた分離菌株数は 248 株であった。分離した 248 株のうち、四連球菌が 227 株で分離菌株の 92% を占めていた。桿菌は 21 株が分離されたが、その試料 No. は、8, 11, 13, 14, 21, 23, 24 の 7 試料のみで、他の試料からは全く分離されなかった。四連球菌の供試菌株を選択する手段として、pH 8.5 と 4.2 に調整した初発 pH 試験での生育と、40°C と 50°C での生育温度試験を行った。その結果、Table 1 に示したように pH 8.5 での生育の有無と、pH 8.5 での生育が弱い 3 グループに分けられた。これらは何れも pH

Table 1 Representative strains of tetrad grouped by growth at pH and temperature.

Group No.	Number of isolated strains	Cell arrangements	Growth at				Representative strains
			pH 8.5	pH 4.2	40°C	50°C	
1	123	Tetrad	+	+	+	—	5-1, 10-5, 18-2, 25-8
2	66	Tetrad	+w	+	+	—	3-2, 7-6, 15-8, 26-2
3	38	Tetrad	—	+	+	—	4-3, 8-1, 20-4, 23-6

Symbol: +w, positive to poor growth

Table 2 Physiological characteristics of representative strains of tetrad isolated from “Murcha”.

Characteristics	Representative strains											
	Group No. 1				Group No. 2				Group No. 3			
	5-1	10-5	18-2	25-8	3-2	7-6	15-8	26-2	4-3	8-1	20-4	23-6
Growth at												
pH 3.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.5	+	+	+	+	+ w	+ w	+ w	+ w	—	—	—	—
Growth at												
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Growth in NaCl												
4.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nitrate reduction	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gelatin liquefaction	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Litmus milk :												
Discoloration	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coagulation	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Peptonization	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Gas production	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fermentation type												
Optical form of	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
lactic acid	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
Fermentation :												
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+
Mannitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Melibiose	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Raffinose	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Starch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sucrose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+

4.2 と 40°C では生育するが、50°C では生育しなかった。各グループより無作為に 4 株ずつ計 12 株を選択し、同定に供した。

桿菌については、全分離菌株を供試菌株として同定した。

2. 球菌の同定

球菌の同定は細胞形態より、全ての球菌が四連球状を示していたことから *Pediococcus* 属として代表株 12 株に対して同定試験を行い、Bergey's Manual の *Pediococcus* 属の分類²⁾に従い同定した。結果を Table 2 に示した。

(1) Group No.1

最大生育 pH 8.5, 10~40°C に生育可能な中温性菌であり、生育限界塩濃度は 7.5% であった。グラム染色は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験は全て陰性であった。発酵形式はホモ型で、DL 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、アラビノース、マルトース、リボース、トレハロースは陽性、また、マンニトール、メレジットース、ソルビトール、デンプン、シュクロースは陰性で文献と一致した。これらの結果よりグループ 1 を *P. pentosaceus* と同定した。

(2) Group No.2

最大生育は pH 8.5 であるが、生育状態は弱かった。10~40°C に生育可能な中温性菌であり、生育限界塩濃度は 7.5% であった。グラム染色は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験は全て陰性であった。発酵形式はホモ型で、DL 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、アラビノース、マルトース、リボース、トレハロースは陽性、また、マンニトール、メレジットース、ソルビトール、デンプン、シュクロースは陰性で文献と一致した。これらの結果より、グループ 2 を *P. pentosaceus* と同定した。

(3) Group No.3

最大生育は pH 8.0, 10~40°C に生育可能な中温性菌であり、生育限界塩濃度は 7.5% であった。グラム染色は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験は全て陰性であった。発酵形式はホモ型で、DL 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、リボース、トレハロースは陽性、また、マンニトール、メレジットース、ソルビトール、デンプン、シュクロースは陰性で文献と一致した。糖類発酵性試験において、文献と異なった結果を示した菌株は 20-4 株のアラビノース、8-1 株のマルトースであるが、全体の結果よりグループ 3 を *P. pentosaceus* と同定した。

初発 pH 試験と生育温度試験により 3 グループに分類し、各グループより代表株を 4 株ずつ供試して同定試験

を行ったが、代表株の全てが *P. pentosaceus* と同定されたため、分離した四連球菌の全てを *P. pentosaceus* と推定した。

3. 桿菌の同定

Table 3 Physiological characteristics of rod isolated from "Murcha".

Group No.	1	2	3
Number of isolated strains	9	9	3
Shape	Rod	Rod	Rod
Growth at			
pH 3.5	+	+	+
4.0	+	+	+
4.5	+	+	+
8.0	+	+	+
8.5	+	+	+
9.0	-	-	-
Growth at			
10°C	+	+	+
30	+	+	+
40	+	+	+
45	-	+	-
Gram reaction	+	+	+
Catalase	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-
Gelatin lipuefaction	-	-	-
Litmus milk :			
Discoloration	-	-	-
Coagulation	-	-	-
Peptonization	-	-	-
Gas production	-	-	+
Fermentation type	Homo	Homo	Homo
Optical form of lactic acid	DL	L	DL
Fermentation :			
L-Arabinose	+	+	+
Cellobiose	+	+	-
Fructose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Gluconate	+	+	+
Glucose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	-
Mannose	+	+	-
Melezitose	+	+	-
Melibiose	+	-	+
Raffinose	+	-	+
Rhamnose	-	+	-
D-Ribose	+	+	+
Salicin	+	+	-
Sorbitol	+	+	+
Starch	-	-	-
Sucrose	+	+	+
Trehalose	+	+	-
D-Xylose	+	-	+

マルチャより分離した桿菌は 21 株あり、全分離株を同定試験に供し、Bergey's Manual⁷⁾に従い同定した結果から、3 種類のグループに分類し、Table 3 に示した。

(1) Group No.1

最大生育 pH 8.5, 10~40°C に生育可能な中温性菌であった。グラム染色は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験、グルコースからのガス発生試験は全て陰性であった。発酵形式はホモ型で、DL 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、ほとんどの糖が陽性で、ラムノースとデンプンは陰性を示し文献と一致した。全体の結果よりグループ 1 を、*Lactobacillus plantarum* と同定した。

(2) Group No.2

最大生育 pH 8.5, 10~45°C に生育可能な高温性菌であった。グラム染色は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験、グルコースからのガス発生試験は全て陰性であった。発酵形式はホモ型で、L 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、ほとんどの糖が陽性で、メレビオース、ラフィノース、デンプン、キシロースは陰性を示し文献と一致した。全体の結果よりグループ 2 を、*L. casei* subsp. *rhannosus* と同定した。

(3) Group No.3

最大生育 pH 8.5, 10~40°C に生育可能な中温性菌であった。グラム染色とグルコースからのガス発生試験は陽性、カタラーゼ試験、硝酸塩の還元試験、リトマスミルク試験は全て陰性であった。発酵形式はヘテロ型で、DL 乳酸を生産した。糖類発酵性試験は、セロビオース、マンニトール、メレジトース、ラムノース、サリシン、デンプン、トレハロースは陰性で文献と一致したが、ソルビトールは文献と異なった。他の糖類は陽性を示した。全体の結果よりグループ 3 を、*L. brevis* と同定した。

以上の結果より、21 株の分離株の同定を Table 4 に示した。*L. plantarum* は 7 試料中 5 試料から、また、*L. brevis* は 2 試料から検出された。また、*L. casei* subsp. *rhannosus* は No.23 の試料のみに生息していた。

以上、ネパールの各地で収集した餅麴マルチャ 26 試料より分離同定された乳酸菌は、わずかに *Lactobacillus* 属が認められたが、全分離菌株のうち約 92% を *P. pentosaceus* に占められており、主要乳酸発酵菌であることが示唆された。さらに、ネパールにおけるマルチャの地域性や民族性による菌種の偏りは認められなかった。そして、東南アジアの広い範囲にわたって、餅麴中から *P. pentosaceus* が高い頻度で分離されるという研究報告¹⁻³⁾に並ぶ結果を得た。これらの原因については

Table 4 Identification of rods isolated from "Murcha".

Murcha No.	Species identified	Number of species/isolates
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4/6
	<i>Lactobacillus brevis</i>	2/6
11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1/1
13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2/2
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1/2
21	<i>Lactobacillus brevis</i>	1/1
23	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhannosus</i>	9/9
24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1/1

前述したように、球菌の増殖速度が速く、他の菌に比べて乾燥に対する耐性が高いことに加えて、餅麴製造時に伝統的に種として前回製造したマルチャの一部を添加して製造を繰り返すという事実から、この乳酸菌相が得られたと推察した。

要 約

ネパールで収集した餅麴マルチャ 26 点から乳酸菌を分離同定し、マルチャの乳酸菌のフロラについて検討した。

乳酸菌は全試料から分離され、分離菌株の 92% を *Pediococcus pentosaceus* で占められており、主要乳酸発酵菌であった。また、*Lactobacillus* 属は 7 試料から分離され、*L. plantarum*, *L. casei* subsp. *rhannosus*, *L. brevis* が同定された。これらの結果から、ネパールにおける餅麴マルチャに含まれる乳酸菌は、地域性や民族性による菌種の違いは認められなかった。また、東南アジア諸国で広く用いられている餅麴と同様に、*P. pentosaceus* が主要乳酸発酵菌であると考えられた。

文 献

- 1) 小崎道雄, 内村 泰: 醸協, 85, 818 (1990)
- 2) 内村 泰, 岡田早苗, 小崎道雄: 醸協, 86, 55 (1991).
- 3) 内村 泰, 新村洋一, 小原直弘, 小崎道雄: 醸協, 86, 62 (1991).
- 4) 村 清司, 小泉幸道, 館 博, 内村 泰: 醸協 91, 895 (1996).
- 5) 小崎道雄監修: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店 (1992).
- 6) K. HEINZ Schleifer, in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. 2, ed. by, P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARPE and J. G. HOLT, Williams & Wilkins, Baltimore p. 1075 (1986).
- 7) O. KANDLER and N. WEISS, in "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. 2, ed. by, P. H. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARPE and J. G. HOLT, Williams & Wilkins, Baltimore p. 1208 (1986).