[農化 第 47 卷, 第 12 号, p. 741~748, 1973]

人工消化脱脂乳の乳酸発酵により生成する 各種窒素化合物の挙動*

越 智 猛 夫

(東北福祉大学)

昭和 48 年 3 月 2 日 受 理

Behaviors of Various Nitrogenous Compounds in Digested and Recombined Skimmilk during Lactic Acid Fermentation (The Basic Researches on the Manufacturing of Ethanol Fermented Milk Beverages Part I)

By Takeo OCHI

Tohoku Social Welfare University

Two strains of lactic acid bacteria, *Streptococcus lactis* 527 and *Lactobacillus bulgaricus* B-1 and a strain of *Saccharomyces sake*, Yabe IFO 0305 were grown in modified skimmilk media which have been digested by trypsin or pepsin under various conditions.

The changes of amino nitrogen content in the digested skimmilk media after incubation with *Str. lactis* were significantly influenced by the initial amino nitrogen content before incubation.

The content of total 80% ethanol-soluble nitrogen in trypsin-digested skimmilk increased during the incubation.

Bitterness found in the digested skimmilk media was removed by lactic acid fermentation, and the extent of the phenomenon with *Str. lactis* is larger than that with *L. bulgaricus*.

The growth of bacteria used was not inhibited by trypsin and pepsin digested media.

The content of amino nitrogen produced by lactic acid fermentation in the digested skimmilk depended on the method of preparation of protein-free solution either by treating with trichloroacetic acid or by centrifuging.

(Received March 2, 1973)

緒 言

脱脂乳に乳酸菌を接種した場合の乳酸菌の蛋白分解力に関して、種々の検討がなされている。*Str. lactis* では Nelson ら⁽¹⁾および佐々木ら⁽²⁾、*L. casei* では Brand-saeter ら⁽³⁾、小沢ら⁽⁴⁾の報告がある。またカゼインのトリプシン消化またはその消化物の生理作用については Fraser ら^(5,6)、Woolley⁽⁷⁾の研究があるほか、Hauro-witz⁽⁸⁾の種々の蛋白質に対するトリプシンの作用、

* アルコール発酵乳製造法の基礎的研究 (第1報)。

Kihara ら⁽⁹⁾の各種合成ペプチドと *L. casei* の発育との関係など多くの報告が発表されている。著者は、脱脂乳からアルコール発酵乳を製造する場合に脱脂乳の高率的な利用の一方法として、発酵前の脱脂乳を pH 調整なしに直接ペプシンまたはトリプシンで消化することを試みるとともに、至適 pH 時または脱脂乳と有機酸を種々混合する際の消化などについて検討を加え、脱脂乳の消化後の乳酸発酵、ついでその後のアルコール発酵という一連の工程を設定するための基礎的条件を確立しようとするものである。本報ではペプシンまたはトリプシンによ

る脱脂乳の消化, その消化脱脂乳における *Str. lactis* および *L. bulgaricus* による乳酸発酵, *Saccharomyces sake* によるアルコール発酵等について, とくに窒素化合物の挙動と供試菌の生育状態を明らかにしたので, その結果を報告する.

実 験 方 法

1. 脱脂乳消化試料の調製

a) 脱脂乳を直接消化する場合: 市販(雪印)脱脂粉乳の 10% 溶液(以下 10% 還元脱脂乳と記す)に同量の蒸留水を加えて 5% 還元脱脂乳とする. この脱脂乳を 100°C, 30 分間加熱殺菌した. 消化のためのペプシン, トリプシン(和光製品)の使用量は脱脂乳 100 ml に対し 50, 150, 250, 350, 500 mg とした. 消化は恒温器中で 40°C に保ち, 2 時間消化を行なった. 消化後は再び 100°C に加熱した.

b) 乳酸を添加する場合: 10% 還元脱脂乳を同量の 2% 乳酸溶液中にマグネチックスターラーで攪拌しながら少量ずつ混合して, 乳酸酸乳を得て a) と同様に酵素を添加して消化試験に供した.

c) クエン酸を添加する場合: 10% 還元脱脂乳を乳酸の場合と同じく混合, クエン酸溶液は 3% 液を用いた. トリプシン消化時は 1N NaOH で pH の調整を行なった.

d) 10% 還元脱脂乳の消化時 pH の調整を行なった場合: ペプシン使用時は 1N HCl で, トリプシン使用時は 1N NaOH で pH を調整した.

e) 10% 還元脱脂乳を直接消化させた場合: 酵素使用量, 消化温度, 時間は a) ~ e) まですべて同一条件を用いた.

2. 脱脂乳消化液の調製 脱脂乳の消化液を乳酸菌培地として使用するため, 以下のように調製した. 市販脱脂粉乳に蒸留水を加えて 10% 還元脱脂乳をつくり, 100°C, 30 分間, 2 回加熱殺菌後, ペプシンあるいはトリプシンをその 100 ml に対し, それぞれ 600 mg, 500 mg の割合で添加し, 40°C 恒温器中で 2.5 時間および 4 時間消化を行なった. ただし, *L. bulgaricus* を用いた場合, ペプシンあるいはトリプシンを滅菌 10% 還元脱脂乳 100 ml に対し 500 mg の割合で添加し, 消化時間は 4 時間とした.

3. 供試菌株 乳酸菌は農林省畜産試験場(千葉市)より分譲された *Str. lactis* 527 および *L. bulgaricus*

B-1 を使用した. 酵母は, 愛媛大学農学部農産製造学研究室に保存されている *Sacch. sake* Yabe IFO 0305 を使用した.

4. 発酵試験法

前培養: 前述のように処理したトリプシン消化液またはペプシン消化液を, それぞれ滅菌した試験管に 10 ml ずつ分注後, 10% 還元脱脂乳に培養した *Str. lactis* または *L. bulgaricus* を 0.5 ml 接種し, 30°C および 40°C の恒温器中で 48 時間培養したものを前培養液とした.

本発酵: 前述のペプシン消化液またはトリプシン消化液は消化開始一定時間後, 100°C, 30 分間加熱して消化酵素を不活性化し, ついでその消化液 47 ml に対し, 前培養液 3 ml を添加し, 30°C, 20 時間および 40°C, 12 時間培養した.

乳酸菌数の測定: 10% 還元脱脂乳を対照として, 10% 還元脱脂乳のトリプシン消化液, および同じくペプシン消化液を各々 10 ml ずつ採り, *Str. lactis* を 2 白金耳ずつ接種して, 30°C, 48 時間培養した後, 所定の寒天培地を用いて 30°C, 48 時間培養時の乳酸菌数を測定した. その培地組成は, ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 4 g, 塩化ナトリウム 8 g, グルコース 10 g, 寒天 20 g, 蒸留水 1 l に定容し, pH 6.5 である.

酵母の生育: 前述同様 10% 還元脱脂乳をトリプシンあるいはペプシンで消化したが, それは乳酸発酵を行わずに pH を 2% 乳酸で調整した. 麦芽汁培地で斜面培養した *Sacch. sake* を 2 白金耳採り, あらかじめ滅菌水に懸濁し, それを各培養液 10 ml 中に 0.1 ml ずつ添加した. 酵母懸濁水中の酵母数は, 2.4×10^7 /ml であった. 各々の培地にショ糖 20% 量を添加し, 30°C で 4 時間培養した後, 室温 (15~20°C) に放置した.

酵母数の測定: 酵母菌体数の測定は, トーマ血球計数器を応用する方法に準じた. 菌数は試料 1 ml 当りの数値で示した.

5. 培養液の各種性状の測定方法

酸度と pH の測定法: 常法に従って, 酸度は試料 10 ml に対する 0.1N NaOH 滴定(指示薬フェノールフタレン)値をもって示した. pH はガラス電極 pH メーター, および東洋濾紙 pH 試験紙を用いて測定した.

アミノ態窒素の測定法: フォルモール滴定法に準じて行なった. ただし 10% トリクロル酢酸 10 ml を試料 10 ml に加えて, 蛋白質を除去したもの, および 10,000 rpm で 15 分間遠心分離後, 上澄液について測定した.

全窒素⁽¹⁰⁾, アルコール⁽¹¹⁾: Conway の微量拡散法によって測定した。

80% アルコール可溶全窒素: 試料 25 ml に無水アルコール 100 ml を添加して, 80% アルコール可溶全窒素を得た後測定した。

苦味度官能試験: 10%還元脱脂乳の酵素消化液およびその乳酸発酵液を 4 人の研究室員で味覚試験して, 苦味を明らかに感ずる場合を+, かなり苦味を感ずるものを++, 著しく苦味を感ずるものを+++, 苦味が明らかに判定しがたいものを±, 全く感じられないものを-として表示した。また苦味の基準液には, 最初の 10%還元脱脂乳の消化液を用いた。供試液は乳酸発酵によって酸度が増加したため, そのままのもの, 3 倍希釈および 6 倍希釈の溶液とし, 苦味度の官能試験に供した。

実験結果および考察

1. 消化条件を異にするときのアミノ態窒素含量の変化

Table I に示すごとく, トリプシンの還元脱脂乳に対する消化力は, pH の調整を行なわない場合でも比較的良好であった。酵素量は 100 ml 当り 150 mg 使用の場合でも良好であり, 500 mg 使用の場合と大きな差異が

Table I. The Amino Nitrogen Content in Recombined Skimmilk and Acid Recombined Skimmilk after Digestion under Various pH Values

Sample No.	pH	Enzyme	Amount of enzyme, mg %				
			50	150	250	350	500
Amino nitrogen content mg/ml							
a	6.4	pepsin	—	—	0.046	0.062	0.139
	6.4	trypsin	—	0.14	0.158	0.170	0.176
b	2.4	pepsin	0.149	0.151	0.158	0.196	0.231
	8.6	*trypsin	0.135	0.147	0.170	0.169	0.181
c	2.4	pepsin	0.143	0.197	0.210	0.216	0.203
	8.8	*trypsin	0.123	0.144	0.204	0.183	0.181
d	2.5	*pepsin	—	—	—	—	0.240
	8.7	*trypsin	—	—	—	—	0.322
e	6.4	pepsin	—	—	—	—	0.137
	6.4	trypsin	—	—	—	—	0.244

* Those pH values were adjusted with either 1N HCl or 1N NaOH.

a: 5% recombined skimmilk, b: mixture equivalent to 2% lactic acid and 10% recombined skimmilk, c: mixture equivalent to 3% citric acid and 10% recombined skimmilk, d & e: 10% recombined skimmilk.

Digestion was made in an incubator at 40°C for 2 hr. For the purpose of determining amino acid content, protein-free solution was prepared through the treatment with trichloroacetic acid.

認められなかった。乳酸およびクエン酸で脱脂乳を酸性にした場合は, トリプシン消化を行なうとき 1N NaOH で pH を調整して実験したが, クエン酸あるいは乳酸による差異は, アミノ態窒素分析値のうえには認められなかった。また, この場合も酵素量の差異はアミノ態窒素量と無関係であった。ペプシンについては, HCl 酸性でなくても, クエン酸あるいは乳酸で, 酸性にしたとき, 酵素量に比例してアミノ態窒素量が増加した。pH 調整を行なわなかった還元脱脂乳の消化性は非常に悪かった。ペプシン, トリプシンいずれによっても, 還元脱脂乳の濃度が 5% および 10% の場合, その濃度に対応してアミノ態窒素量は増加せず, 特にペプシンの場合は, pH 調整を行なったときに, わずかに濃度に応じてアミノ態窒素量は増加するが, 無処理の場合はほとんど同じ値を示した。ペプシンの場合は凝乳作用がトリプシンに比べ強いことが, 加水分解度に関係するのではないかと考えられる。酵素使用量が少なく, pH があまり酸性になっていないようなとき, 特に上記の傾向があらわれるようである。鴨田は総説⁽¹²⁾でペプシン, トリプシンの推定水解度を 31% および 23% と述べている。その場合のペプシン添加量は 14 mg/g カゼイン, トリプシン添加量 7 mg/g カゼインで, 反応は 5% カゼイン溶液,

pH 7.4, 40°C, 72 時間の条件下で行なっている。この推定水解度は, 本実験の場合に比べて高い。本実験では, 酵素使用量は比較的多いが, 消化時間が短いため, それが結果に差異を生じたものと考えられる。水解度の差異は, 酵素使用量よりも消化時間がより強く影響するように考えられる。

2. 培養による各種性状の変化

1) pH および酸度の変化: 乳酸発酵中の pH および酸度の変化については, Fig. 1 に示すごとく, ペプシン消化液もトリプシン消化液もほぼ同様の傾向を示した。消化液の分解度の差異よりも, 乳酸菌種による差異が顕著にあらわれた。一般にいわれているように *L. bulgaricus* は酸生成が強く, 本実験においても同様の結果を示した。酸度および pH の変化から見れば, ペプシン消化培地よりもトリプシン消化培地の方が, *Str. lactis*, *L. bulgaricus* の生育にわずかによい影響を与えるように考えら

Fig. 1. Changes of pH Values and Acidity in Lactic Acid Fermented Media Inoculated with *Str. lactis* 527 or *L. bulgaricus* B-1.

— *Str. lactis*, --- *L. bulgaricus*, Δ pH value in trypsin-digested media (10% recombined skimmilk), $\blacktriangle$ acidity in trypsin-digested media (10% recombined skimmilk), $\circ$ pH value in pepsin-digested media (10% recombined skimmilk), $\bullet$ acidity in pepsin-digested media (10% recombined skimmilk).

れる。

2) 乳酸菌数および酵母数の変化: 乳酸菌培養培地としての 10% 還元脱脂乳のトリプシン消化液はアミノ態窒素 23.2 mg % を, 同じくペプシン消化液はアミノ態窒素 37.1 mg % をそれぞれ含み, それらを用いて *Str. lactis* 培養後の菌数を測定した。乳酸菌数測定用の選択

Table II. The Number of Cells in Digested and 10% Recombined Skimmilk after Incubation

Medium	Strain	Cells/ml
Digested with trypsin	<i>Str. lactis</i> 527	3×10^7
Digested with pepsin	<i>Str. lactis</i> 527	3×10^7
10% recombined skimmilk	<i>Str. lactis</i> 527	1×10^7

Medium was composed of 10 g polypeptone, 4 g yeast extract powder, 8 g NaCl, 10 g glucose, 20 g agar/l distilled water. The pH value was 6.5, and incubation was made at 30°C for 48 hr.

培地については種々考案⁽¹³⁾されているが, ここでは味噌, 醤油関係の乳酸菌分離培地として使用されている培地組成の一部を変更し, 使用した。結果は Table II に示すとおり, 酵素消化培地での乳酸菌数は対照培地脱脂乳区と同等以上であり, トリプシン, ペプシン消化液中には乳酸菌の生育を阻害する物質が存在しないと推量した。

一方, 酵母の生育に脱脂乳のトリプシンおよびペプシンによる消化液がどのように影響するかについて, 知見を得るため実験を行なった。培養培地に使用した 10% 還元脱脂乳のトリプシン消化液のアミノ態窒素は 0.358 mg/ml, ペプシン消化液のそれは 0.335 mg/ml であった。結果は Table III に示した。なお, 接種直後の酵母

Table III. The Number of Cells, Amino Nitrogen and Alcohol Content in Digested Skimmilk Determined throughout the Course of Incubation with *Sacch. sake*

Sample No.	Determination	Incubation period (day)				
		2	3	5	7	9
No. 4	cells/ml	1.7×10^7	3.3×10^8	3.5×10^8	3.3×10^8	2.8×10^8
	alcohol (%)	0.43	5.7	7.3	10.3	8.7
	amino nitrogen content mg/ml	0.266	—	0.314	—	0.165
No. 11	cells/ml	1.1×10^7	8.7×10^7	1.5×10^8	1.6×10^8	1.5×10^8
	alcohol (%)	0.22	4.2	6.1	9.55	8.4
	amino nitrogen content mg/ml	0.294	—	0.297	—	0.266
No. 6	cells/ml	2.3×10^7	1.8×10^8	1.6×10^8	3.1×10^8	3.2×10^8
	alcohol (%)	0.59	4.2	7.3	9.55	8.47
	amino nitrogen content mg/ml	0.252	—	0.227	—	0.260
No. 7	cells/ml	3.5×10^7	1.0×10^8	9.9×10^7	3.4×10^8	2.7×10^8
	alcohol (%)	0.69	4.7	6.1	9.5	6.4
	amino nitrogen content mg/ml	0.218	—	0.222	—	0.218

No. 4: trypsin-digested and 10% recombined skimmilk with pH 3.6, No. 11: pepsin-digested and 10% recombined skimmilk with pH 3.6, No. 6: pepsin-digested and 10% recombined skimmilk as well as trypsin-digested and 10% recombined skimmilk prepared in a ratio of 3:7 (volume) with pH 4.1, No. 7: pepsin-digested and 10% recombined skimmilk as well as trypsin-digested and 10% recombined skimmilk prepared in a ratio of 7:3 (volume) with pH 4.0.

20% sugar (sucrose) was added to digested skimmilk, while the pH value was adjusted with 2% lactic acid.

数は $2.4 \times 10^5/\text{ml}$ である。トリプシン消化液培地はペプシン消化液に比べ、わずかに適しているような結果を示すが、試料 No. 7 の酵母数をみると、一概にペプシン消化液の方が酵母の生育に適した培地であるとはいえない。アミノ態窒素量はアルコール発酵によって減少した。pH 3.6~4.1 の範囲内では、増殖の差異は認めることができなかった。Table III の結果から、トリプシンおよびペプシンによる消化液は、*Sacch. sake* の生育を阻害しないと推量した。

3) 全窒素およびアミノ態窒素の変化

a) *Str. lactis* 使用の場合：乳酸発酵における経時的アミノ態窒素含量の変化は Fig. 2 に示した。乳酸発酵開始時よりアミノ態窒素含量が増加したのは、ペプシン区において 7~10 時間目であり、以後減少して 20 時間後わずかに増加したが、ほとんど開始時と変わらない程度であった。トリプシン区では、7 時間後にわずかに増

Fig. 2. Changes of Amino Nitrogen Content in Lactic Acid Fermented Media Inoculated with *Str. lactis* and Incubated at 30°C for 20 hr.

△ trypsin-digested and 10% recombined skimmilk media, ○ pepsin-digested and 10% recombined skimmilk media.

Table IV. Amino Nitrogen and Total Water Soluble Nitrogen Contained in Digested and 10% Recombined Skimmilk after Incubation

Medium	Initial sample		After 20 hr	
	Amino nitrogen (mg/ml)	Total water soluble nitrogen	Amino nitrogen (mg/ml)	Total water soluble nitrogen
Pepsin-digested	0.237	2.51	0.263	2.24
Trypsin-digested	0.371	4.89	0.507	5.05

Highly hydrolytic samples of 10% recombined skimmilk digested either with pepsin or trypsin were initially used for incubation.

Str. lactis 527 was employed as the strain and incubated at 30°C for 20 hr.

加した以外はすべて減少した。

b) 脱脂乳の消化度の高いとき：消化の程度により、乳酸発酵時のアミノ態窒素含量の消長にどのような影響があらわれるかについて実験を行なった結果は Table IV に示す。トリプシン区では、アミノ態窒素含量が相当量増加した。ペプシン区でもわずかに増加した。トリプシン区については、開始時のアミノ態窒素の含有量の多少が培養時のアミノ態窒素の消長に影響を与えた。消化度の高い培地では、*Str. lactis* プロテアーゼにより効率よく低分子化が進行した。

乳酸菌の蛋白分解作用について、大宮ら⁽¹⁴⁾の総説の中で Cowman らは *Str. lactis* の菌体内物質より精製して得たプロテアーゼが、アラニン、アスパラギン酸あるいはアスパラギンを含むジ-およびトリ-ペプチドを加水分解することができた。また酸化インシュリンB鎖のこの菌体内プロテアーゼによる加水分解ペプチドのN末端にアラニン、アスパラギン酸あるいはアスパラギンは検出されず、これらのアミノ酸は遊離の状態で存在することが認められたことから、これら3種のアミノ酸の両側のペプチド結合を開裂するものと推定している。また嶋田⁽¹²⁾は、おもなプロテアーゼの性質およびその酸化インシュリンB鎖に対する作用について、分解速度の表示など表にまとめ報告している。その表から推定すると、トリプシンのように基質特異性の狭い酵素によって処理した後、*Streptococcus* プロテアーゼのような基質特異性が広く、分解速度の速い酵素の組み合わせが、トリプシン消化培地では反映したのか、またペプシン消化培地では、消化物と *Streptococcus* プロテアーゼとの作用機序が異なるためか、疑問は残るが、本実験では *Str. lactis* の分解力に差が認められた。消化物中のアミノ態窒素含量の差異のみでなく、大きな要因として窒素化合物の形態が *Str. lactis* プロテアーゼ作用に差を生じて、培地窒

素化合物の組成を変化させるように考えられる。今後の問題として、窒素化合物の形態別定量分析を経時的に行なってみる必要があろう。また、トリプシンおよびペプシン消化液に *Str. lactis* を接種した場合のアミノ態窒素の消長について論ずる際には、消化液のアミノ態窒素を考慮する必

Table V. Total 80% Ethanol-soluble Nitrogen Contained in Digested and 10% Recombined Skimmilk after Incubation

Medium	Initial sample	After 20 hr
Pepsin-digested	1.925	0.98
Trypsin-digested	1.800	2.28

Amino nitrogen contained in the initially used samples for the pepsin-digested medium was 0.208 mg/ml, while the same employed for the trypsin-digested medium was 0.267 mg/ml.

St. lactis 527 was used as the strain and incubated at 30°C for 20 hr.

要がある。

c) 80%アルコール可溶全窒素、水溶性全窒素含量の変化：乳酸発酵によって生ずる 80% アルコール可溶全窒素の変化については、Table V に示した。同様に、水溶性全窒素については Table IV に示した。水溶性全窒素については、ペプシンおよびトリプシンによる水解度の高い試料を用いた。80%アルコール可溶性および水溶性全窒素は、ペプシン区ではいずれも減少し、トリプシン区ではいずれも増加しているが、その変化は 80% アルコール可溶性全窒素において特に著しかった。ペプシン消化区において、80%アルコール可溶性全窒素の減少は、トリプシン凝乳力価よりペプシンの方が大であるため、ペプシン分解物に対する前述の *Streptococcus* プロティナーゼとの関係など考えられるし、また増殖に伴って菌体成分にとり入れられる点など問題は多いが、*Str. lactis* プロテアーゼ作用によってペプシン区では低分子化があまり進展せず、トリプシン区では増加するという対称的な結果を示した。なお *Str. lactis* のプロティナーゼの至適 pH は酸性側にあるが、全カゼインを基質とする場合と各種カゼインを基質とするときでは、その至適 pH の値が異なると報告⁽¹⁸⁾されている。本実験における 80%アルコール可溶全窒素含量の変化に対応する酸度と pH の変化は、Fig. 1 の *Str. lactis* の曲線に示されている。

d) *L. bulgaricus* を使用した場合：*L. bulgaricus* 使用時の試料分析結果は、以下のとおりである。10%還元脱脂乳分析値：pH 6.2, 0.1N NaOH 滴定酸度, 3.45 ml/10 ml, アミノ態窒素 0.116 mg/ml, 水溶性全窒素 5.66 mg/ml, 10%還元脱脂乳ペプシン消化液：pH 5.2, 酸度 4.4 ml/10 ml, アミノ態窒素 0.477 mg/ml, 水溶性全窒素 3.58 mg/ml, 10%還元脱脂乳トリプシン消化液：pH 6.0, 酸度 4.18 ml/10 ml, アミノ態窒素 0.54

Fig. 3. Changes of Amino Nitrogen Content in Lactic Acid Fermented Media Inoculated with *L. bulgaricus* B-1 and Incubated at 40°C for 12 hr.

△ trypsin-digested media, ○ pepsin-digested media, protein-free solution was prepared by treating, trichloroacetic acid (—) or by centrifuging (---).

mg/ml, 水溶性全窒素 5.13 mg/ml である。アミノ態窒素は除蛋白液を 10,000 rpm, 15 分間遠心分離後、試料として測定した。

乳酸発酵過程におけるアミノ態窒素含量の変化は、Fig. 3 に示した。乳酸発酵によって 10~12 時間後には、アミノ態窒素が増加した。Fig. 2 の *Str. lactis* の場合はトリクロル酢酸 (TCA) 処理後測定したが、概して TCA 処理が低い値を示す。また消化区別にみれば、ペプシン区はトリプシン区に比べ、処理方法のちがひによる分析値のパラツキが大であった。

4) 苦味の生成：脱脂乳はプロテアーゼ処理するとき、苦味を生ずる。この苦味の除去に乳酸菌が効果的に作用することを著者⁽¹⁰⁾は確認している。特に二つの菌株について、どのように消失するかを呈味試験した結果を Table VI に示した。*Str. lactis* は *L. bulgaricus* に比べ、苦味を除去する力が強力である。発酵開始後 10 時間で苦味が除去されるが、Fig. 1 の酸度曲線も大きく変化した時期であり、一定の乳酸菌数に達したときに目的が達せられる。*L. bulgaricus* は Fig. 1 から推量して、旺盛な増殖を行なっていると思われるにもかかわらず、苦味を除去する能力は緩慢である。苦味は、乳酸発酵生産物である乳酸とは関係がない。

プロテアーゼ使用時に生ずる苦味については、種々検討されている。大豆蛋白質のペプシン加水分解物中の非

Table VI. The Effects of Lactic Acid Bacteria on the Removal of Bitter Taste of Digested Skimmilk

Medium	Strain	Incubation time (hr)							
		0	3	5	7	8	10	12	20
Pepsin	<i>Str. lactis</i> 527	++	++	+	±	—	—	—	—
Trypsin	" "	+++	+++	++	++	—	—	—	—
Pepsin	<i>L. bulgaricus</i> B-1	++		+		+	±	±	
Trypsin	" "	+++		++		++	+	±	

The marks such as +, ++ and — indicate either the strength or the absence of bitterness.

Trypsin or pepsin indicates either trypsin or pepsin-digested and 10% recombined skimmilk.

透析性苦味と化学構造について⁽¹⁷⁾, またトリプシンによるカゼインの加水分解物中の苦味ペプチドの単離とそれらの化学構造⁽¹⁸⁾の第1次構造が決定され, 苦味発現にはチロシン, フェニールアラニンなどのペプチドの位置が重要であると推定されている。佐藤ら⁽¹⁹⁾はカゼインの消化物中の苦味に対し, 乳酸菌体内粗酵素液の苦味除去作用について, 鶴田⁽¹²⁾によると牛乳蛋白質のプロテアーゼによって生成する苦味ペプチドは, アミノペプチダーゼの作用によって, その苦味が消失するが, カルボキシペプチダーゼは必ずしも有効ではなく, そのN末端のアルギニンとグリシンがアミノペプチダーゼの作用により遊離すると苦味が消失する。山本ら⁽²⁰⁾は枯草菌アルカリプロテナーゼで消化した牛乳カゼイン中の苦味ペプチドの構造式を明らかにし, N末端のアルギニンを遊離させても苦味は変わらないが, その隣りのグリシンを遊離させると苦味は消失するとし, 苦味は少なくとも Gly-Pro-Pro-Phe に基づくものと結論している。Table VI の結果と関係のある乳酸菌体酵素については, Williamsson ら⁽²¹⁾による *Str. lactis* の菌体外プロテナーゼや, Cowman ら⁽²²⁾ の *Str. lactis* からの細胞膜酵素の抽出, など考えあわすとき, 菌体のどの部位の酵素が先に作用効果を示すのか, また乳酸菌の自己消化による菌体酵素の放出, その時期などの点も考慮する必要がある。また水産動物肉の消化による苦味の研究⁽²³⁾で, 苦味は酵素の種類, pH によらず, 高力価の酵素を使用する場合に著しいと報告されている。その発生原因は, 糖類存在下で消化した際に生成するアミノ酸が関係し, その加熱によってある種のペプチド類が生成するためといわれる。Harwalkar ら⁽²⁴⁾は, *Str. cremoris* の苦味生産株と非生産株を脱脂乳その他の培地に培養し, 苦味ペプチドの生成機構を究明した結果, 苦味成分の根源は菌による *de novo* 合成よりも, 菌の酵素によるカゼインの分解にあ

ると報告している。Table VI の結果から, 脱脂乳のプロテアーゼ消化によって生成する苦味は, 乳酸菌のアミノペプチダーゼの作用によって消失する⁽¹²⁾ものと考えられる。Harwalkar ら⁽²⁴⁾による苦味の根源がカゼイン分解にあるという点は理解できるが, 本実験のように限定された培地, 期間内での酵素作用としては, カゼイン分解よりもアミノペプチダーゼ系統の酵素作用が先行するか, または強力であるため苦味除去作用と結びつき, また苦味は蛋白分解時の中間物として比較的消化されやすく, 乳酸菌の窒素代謝活性および乳酸菌の生育と深い関係があるように考えられる。*L. bulgaricus* と *Str. lactis* の苦味除去力の差異は, 酸生成速度による差が酵素活性に影響したのか, 関与酵素の差かは今後の問題とした。

要 約

トリプシンおよびペプシンによって脱脂乳の蛋白質を分解して得られた消化液に *Str. lactis*, *L. bulgaricus* をそれぞれ単独に接種培養し, それらの乳酸発酵により生ずる変化を経時的に調べて比較し, また同液に *Sacch. sake* を接種培養して, その生育状況をも調べた。

1. 種々の程度にトリプシン, ペプシンにより消化した脱脂乳液を培地として, *Str. lactis* を培養した場合, 培地中のアミノ態窒素含量は, 培地の分解程度のちがいに異なった変化を示した。トリプシン分解培地では, 80%アルコール可溶全窒素が増加した。

2. トリプシンおよびペプシンにより脱脂乳を消化するとき生ずる苦味を除去する作用は, *Str. lactis* の方が *L. bulgaricus* より強力である。脱脂乳のトリプシン, ペプシンによる分解物質は *Str. lactis*, *L. bulgaricus* および *Sacch. sake* の生育を阻害しない。

3. 脱脂乳のトリプシンあるいはペプシンにより得られる分解液を培地として, *L. bulgaricus* を培養した溶液中のアミノ態窒素含量は, 除蛋白の際, TCA 処理を行った場合と遠心分離 10,000 rpm によって処理した場合とでは, 測定値に差を生じた。

以上のごとく本実験に用いた乳酸菌の2菌株には, 乳酸発酵における窒素化合物の代謝活性に差があることが示唆された。

終りにのぞみ、ご指導賜った元愛媛大学農学部石丸義夫教授、ならびに本実験を遂行するにあたりご協力いただいた元愛媛大学農学部生物化学研究室松井宗明氏に厚く感謝します。

- (1) W.C. Van der Zant and F.E. Nelson: *J. Dairy Sci.*, **36**, 1212 (1953).
- (2) 佐々木林治郎, 中江利孝: 日畜会報, **30**, 7 (1959).
- (3) E. Brandsaeter and F.E. Nelson: *J. Bact.*, **72**, 68 (1956).
- (4) 小沢康郎, 見坊 寛: 農技研報, **G 6**, 51 (1953).
- (5) D. Fraser and R.E. Powell: *J. Biol. Chem.*, **187**, 803 (1950).
- (6) D. Fraser and F.H. Johnson: *ibid.*, **190**, 417 (1951).
- (7) D.W. Woolley: *ibid.*, **162**, 383 (1946).
- (8) F. Haurowitz, M. Tunca, P. Schwerin and V. Göksu: *ibid.*, **157**, 621 (1945).
- (9) H. Kihara and E.E. Snell: *ibid.*, **197**, 791 (1952).
- (10) E. J. Conway: "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error," Crosby Lockwood, 4th ed, 1957, p. 90.
- (11) E. J. Conway: *ibid.*, 1957, p. 248.
- (12) 鶴田文三郎: 日畜会報, **41**, 603 (1970).
- (13) 中西武雄: 牛乳と乳製品の微生物, 地球出版, 1967, p. 246.
- (14) 大宮邦雄, 佐藤 泰: 酪農科研, **18**, A-1 (1969).
- (15) 中西武雄: 牛乳と乳製品の微生物, 地球出版, 1967, p. 84.
- (16) 越智猛夫: 特許公告, 昭 39-15243.
- (17) S. Arai, M. Yamashita, H. Kato and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 729 (1970).
- (18) T. Matoba, R. Hayashi and T. Hata: *ibid.*, **34**, 1235 (1970).
- (19) 佐藤 泰, 関口義彰, 千葉善根, 猪飼勝弘: 農化, **43**, 286 (1969).
- (20) N. Minamiura, Y. Matsumura, J. Fukumoto and T. Yamamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 588 (1972).
- (21) W. T. Williamson, S. B. Tove and M. L. Speck: *J. Bacteriol.*, **87**, 49 (1964).
- (22) R. A. Cowman and M. L. Speck: *Appl. Microbiol.*, **15**, 851 (1967).
- (23) 北林邦次, 首藤勝夫, 中村邦典, 石川宣次: 北海道水産試報, **1**, 88 (1963).
- (24) V. R. Harwaikar and E. W. Seitz: *J. Dairy Sci.*, **54**, 12 (1971).