ノート

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi*
Vol.61, No. 3, pp. 357~359, 1987]

リンゴ浸漬水より分離した饅頭醗酵性
細菌 (*Enterobacter cloacae*) の
同定について

長野宏子, 大森正司*, 庄司善哉**
(岐阜大学教育学部, *大妻女子大学食物学科,
**秋田大学教育学部)

昭和 61 年 3 月 11 日 受理

The Isolation and Identification of Leavening
Bacteria (*Enterobacter cloacae*) of
Wheat Flour Dough from Soaking
Water of Sliced Apple

Hiroko NAGANO, Masashi OMORI* and
Zenya SHOUJI**
Faculty of Education, Gifu University,
Gifu 501-11

* Department of Food Science, Otsuma Women's
University, Chiyoda-ku, Tokyo 102

** Faculty of Education, Akita
University, Akita 010

The water in which fruits or vegetables are soaked is often used in traditional recipes of "Mantou" fermentation in China. It is already known that wild yeasts play an important role in leavening. The study have reports on the successful isolation of the sole microorganism in the water of soaked apple slices. The isolate was identified as *Enterobacter cloacae*. It was confirmed that this strain aided in Mantou-leavening.

(Received March 11, 1986)

小麦粉醗酵食品, とくにパン製造における膨化剤としては, パン酵母が一般的でよく用いられている。しかし, 膨化には野生酵母や, その他の微生物も関与していること⁽¹⁾が知られており, 製品の風味や品質, 物性などに好ましい影響を与えているとの報告⁽²⁾もみられる。古来から, 中国などでは饅頭の醗酵⁽³⁾に秘伝として果物や野菜の浸漬水を, いわゆる果実種として用いる方法があ

る。

著者らは, 中国料理専門家より聴聞したことをもとにスターター調製から, 饅頭作りまで再現した。その結果, スターター調製時にリンゴ浸漬水を用いたものは, 膨化性が優れ, 酸産生が少なく, 食味, フレーバーの良い饅頭を作ることが可能であった。そこから純粋分離した微生物は, *Enterobacter cloacae* と同定され, また, 本細菌を用いて饅頭を製造したところ, リンゴ浸漬水を用いた場合と同様に良好な結果が得られた。

実験方法としては従来行われていた方法をモデル化して行った。すなわち, リンゴ (フジ, つがる) を剥皮後, 芯を除いてスライスし, これにリンゴと同量の蒸留水を加えて浸漬, 30°C の恒温槽で 48 時間保温放置した。これを経時的に取り出し濁度, pH, 還元糖の量, ガス発生量を測定した。リンゴ浸漬水を濾紙で濾過した後, 濁度は 660 nm の吸光度で, 還元糖はソモギネルソン法で測定した。ガス発生量は, リンゴをみじん切りにしリンゴと同量の水に 10 分間浸漬, ゆるく 1 分間攪拌抽出後濾過, 25 ml の濾液をアインホルン管に入れ 30°C で保温することによりガス発生量を測定した。また, 30°C で 48 時間保温したリンゴ浸漬水から普通寒天培地 (栄研) を用いて微生物を分離した。分離菌の生育適温は, グルコース 20 g, アスパラギン 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.28 g を蒸留水で 1,000 ml にした pH 6.4 の G 培地⁽⁴⁾を用いて行った。

スライスしたリンゴを蒸留水中に浸漬し, 保温させた時のリンゴ浸漬水の濁度は, ガス発生量とほぼ同様の S 字型カーブを示し, 48 時間ではほぼ定常期に達した。また濁度の増加はガス発生より早く始まった。このとき得られたガスの発生量は 10 ml であり, その約 2/3 は二酸化炭素で, 残りの約 1/3 は水素ガスであった。

リンゴ浸漬直後の pH は 4.3 で 24 時間まで増加し, 最大 pH が 5.1 を示した後は pH 4.8 くらいまで低下した。しかし, pH 低下は緩慢であり pH が 4.5 以下にならないことから, 饅頭に用いても酸味を感じることなく良好な風味を与えることが期待できる⁽⁵⁾。還元糖含量の変化も pH と同様の傾向を示し, 24 時間以後は微生物の増殖が対数期に入り還元糖含量は減少するのが観察された。

リンゴ浸漬水中の微生物群には, 酵母の存在は認められず, 細菌のみが認められた (Fig. 1 [I])。ここに存在する微生物群を純粋分離し, 数株の細菌が単離された。

Fig.1. Photomicrographs of Microorganisms in Soaking Water of Sliced Apple. Microorganisms were stained with Wright stain method [I], and the cell-shape of the isolated strain GAO [II]. The scale represents 10 μ m.

これらのガス産生を測定するとともに饅頭を製造し、最も効果の認められた株を GAO 株と名づけた。この GAO 株の形態は顕微鏡写真にみられるように桿菌であった (Fig.1 [II])。

Cowan & Steel らの方法⁽⁹⁾および Bergey の細菌分類マニュアル⁽⁷⁾に準拠して GAO 株の同定を試み、その諸性状を Table I に示した。このうち、エスクリン分解で Bergey's Manual 記載データと異なる性状がみられたが、その他の性状はすべて一致したので *Enterobacter cloacae* と同定した。また、融解温度 (Tm) 法⁽⁹⁾による DNA の GC 含量測定を行ったところ、G+Cmol% は 54 (Tm) と計算され、Bergey's Manual 記載データと一致した。HPLC 法⁽⁹⁾によるキノン型の分析を行った結果、ユビキノン Q-8 を有することが判明した。Swason ら⁽¹⁰⁾もリンゴ果汁製造工程中の微生物の検討を行い、カビ、酵母および細菌を分離しているが、今回分離した細菌と同一のものは認められていない。

Table I. Some Properties of Bacterium Isolated from Soaking Water of Sliced Apple

Characteristics	Isolate	<i>Enterobacter cloacae</i> ⁽⁷⁾
Shape	rod	rod
Spore	—	—
Gram stain	—	—
Oxidase	—	—
Catalase	+	+
O/F	F	F
Gas formation (Glucose)	+	+
Indole formation	—	—
H ₂ S	—	—
Deamination of phenylalanine	—	—
NO ₃ reduction	+	+
Urea Decomposition	—	—
Utilization of citrate	+	+
Utilization of malonate	+	+
Esculin hydrolysis	+	—
VP test	+	+
Arginine dihydrolase	+	+
Decarboxylase of lysine	—	—
Decarboxylase of ornithine	+	+
B-Galactosidase	+	+
Acid formation from :		
adonitol	—	d
arabinose	+	+
inositol	—	—
sucrose	+	+
dulcitol	+	[—]
sorbitol	+	+
maltose	+	+
mannitol	+	+
lactose	+	+
raffinose	+	+

d, differs among strains ; [—], 11–25% positive.

生育適温をみるために、G 培地を用いたときの *E. cloacae* GAO 株の増殖曲線を Fig. 2 に示した。 *E. cloacae* GAO 株および *E. cloacae* の基準株である IAM 12349 株を用いてその性状を比較したところ、増殖の立ち上がりの早さは 37°C, 30°C, 25°C の順であった。しかしながら、IAM 12349 株では 30°C のときに最終生育度がよく、また *E. cloacae* GAO 株は 25°C において最も最終生育度がよかった。両株とも 37°C の場合に比べると 25°C, 30°C のほうが生育がよく、とくに 25°C においては *E. cloacae* GAO 株の最終生育度の良好なことが認められた。また、30°C では、両株とも同程度の生育を示した。これは今回分離した細菌 *E. cloacae* GAO 株の培養時の至適温度は 25–30°C にあることを示している。こ

Fig. 2. Growth Curve of *Enterobacter cloacae*. IAM 12349 [I] and isolated strain (GAO) from soaking water of siliced apple [II]. O, 25°C; Δ, 30°C; □, 37°C. Culture media (pH 6.4): 20 g of glucose, 2 g of asparagine, 0.5 g of KH_2PO_4 , 0.28 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 1000 ml of D. W.

のことは、伝統的に行われていた自然醗酵法による饅頭製造が、室温からやや高めのところで行われていたこととうまく合致する。

分離細菌 *E. cloacae* GAO 株をG培地で培養 (30°C) 後、培養液を饅頭製造に用いた場合の特性を検討した。その結果、冷蔵障害を起こす場合があるパン酵母と異なり⁽¹¹⁾、この細菌の場合は饅頭生地冷蔵障害もなく、また生地を1年近く -15°C で冷凍保存しておいた後も、スターターとして十分使用可能であった⁽¹²⁾。これらのことは本細菌の実用上からも有効な点である。

本論文をまとめるにあたり、ご丁寧なご助言を賜りました東京農業大学小崎道雄教授、温度適性の測定に便宜をはかっていただいた日本大学農獣医学部室岡治義教授、中嶋睦安助教授、また、GC 含量測定に際しお世話

をいただきました東京大学応用微生物研究所山里一英博士、ユビキノンの提供を賜りましたエーザイ株式会社山野喜昭氏に深謝いたします。

本研究の概要は、昭和60年7月31日、日本農芸化学会大会において発表した。また、本研究の一部は昭和61年度文部省科学研究費補助金 (一般 C, No. 61580062) の助成を受けて行われたものでここに謝意を表します。

- (1) 中尾佐助:「料理の起源」, 日本放送出版協会, 1972, p. 49.
- (2) 武田泰輔, 岡田早苗, 小崎道雄: 日食工誌, **31**, 642 (1984).
- (3) 主婦の友社編:「中国料理の基礎」, 主婦の友社, 1957, p. 118.
- (4) V. C. Kramer, D. M. Calabrese and K. W. Nickerson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 973 (1980).
- (5) 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉: 家政誌投稿中.
- (6) S. T. Cowan and K. J. Steel, 坂崎利一訳:「医学細菌同定の手びき」, 第2版, 近代出版, 1983.
- (7) C. Richard: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology," Vol. 1, ed. by N. R. Krieg and J. G. Holt, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, p. 465.
- (8) 金子太吉:「微生物の化学分類実験法」, 駒形和男編, 学会出版センター, 1982, p. 239.
- (9) 山田雄三, 倉石 衍:「微生物の化学分類実験法」, 駒形和男編, 学会出版センター, 1982, p. 143.
- (10) K. M. J. Swason, S. B. Leasor and D. L. Downings: *J. Food Sci.*, **50**, 336 (1985).
- (11) 庄司一郎, 倉沢文夫: 家政誌, **30**, 780 (1979).
- (12) 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉: 昭和60年度日本家政学会年次大会 (37回) 研究発表要旨集, 1985, p. 62.