有孢子乳酸菌の香気生産性に関する研究

慶田 雅 洋*, **・綿貫 雅 章*・津 郷 友 吉*

Studies on the Aroma Production of Spore-Forming Lactic Acid Bacteria

MASAHIRO IWAIDA*, ** MASAOKI WATANUKI* and TOMOKICHI TSUGO

Four stocks of spore-forming lactic acid bacteria, i.e. *Bacillus coagulans* IAM 1115, 1146, 1171 and 1194, were tested for the aroma producibility in milk culture. No utilization of citrate was confirmed by two techniques. The flavor of yoghurt and cottage cheese was improved by the use of *B. coagulans* in starter mixture. A noted flavor was observed in yoghurt manufactured by the use of *B. coagulans* IAM 1194; while the employment of either *B. coagulans* IAM 1146 or 1171 resulted in the appearance of strong flavor and acidity in cottage cheese. Increase in acetoin content was observed during the storage (48 hrs at 4°C) of cottage cheese, prepared employing *B. coagulans*. However, there are still many technical problems to be conquered for the use of *B. coagulans* as a single starter for the manufacture of soured milk products. (Received July 21, 1969)

有孢子乳酸菌は北原¹⁾ および中山²⁾ によって分類学的立場から研究され、その生理学的性質については詳細に検討されている。しかしながら乳業における本菌の応用についてはまだ研究報告も少なく、広範囲に系統的には行なわれていないが、本菌を乳酸菌スターターを使用する乳製品の製造に応用し、細胞自体の耐熱性も強いという特徴を利用すれば、乳製品の品質を改良し新しいタイプの製品を開発することも可能であると考えられる。そのためにはまず有孢子乳酸菌の香気生産性、蛋白分解活性、脂肪分解活性などについて検討することが必要であると考えられる。したがって本研究においては、まず有孢子乳酸菌の香気生産に関する基礎的な検討を行なったのちに、本菌をカテージチーズおよびヨーグルトの製造に応用した結果についてここに報告する。

実 験 材 料

1. 使用菌株

中山²⁾ は 1947 年から数年間にわたって 246 種のカテージ陽性乳酸桿菌を分離し、これらはすべて広義の *Bacillus coagulans* に属することを明らかにしている。ここではそれらの中から *B. coagulans* IAM 1115, 同

IAM 1146, 同 IAM 1171 および同 IAM 1194 の 4 菌株を使用した。

カテージチーズの製造に当たっては一部 HANSEN スターターを使用した。本スターターは CHR. HANSEN 社の凍結乾燥粉末スターターであって、数種のホモ発酵型乳酸菌 (*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*) のほかに香気生産菌として *Streptococcus diacetilactis* および *Leuconostoc citrovorum* を含む³⁾。またヨーグルトの製造に当っては *Lactobacillus bulgaricus* も使用した。

2. 培 地

有孢子乳酸菌 *B. coagulans* の前培養には次の組成のものを使用した (以下グルコースブロスと呼ぶ)。ただし保存培地の場合にはグルコースは添加せず 1.8% の寒天を使用した⁴⁾。

酵母エキス 5g, ペプトン 5g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{K}_2\text{H-PO}_4$ 0.5g, グルコース 20g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, NaCl 0.01g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, 水道水で 1l となす (pH 7.0)。

また HANSEN スターターおよび *L. bulgaricus* の前培養には滅菌脱脂乳を使用した。

* 東京大学農学部農芸化学科: 東京都文京区弥生 1-1-1

Department of Agricultural Chemistry, the University of Tokyo. Bunkyo-ku, Tokyo.

** 現在勤務先: 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Present address: National Institute of Hygienic Sciences. Setagaya-ku, Tokyo.

実験方法

1. 菌の発育の測定

B. coagulans を 40°C に 72 時間の前培養を 2 回行ったのちに、その培養液をグルコースブロスに 1 v/v% 加え、試験管に 10 ml ずつ分注して 40°C で培養し、4~5 時間ごとに試験管を取り出し 660 m μ における吸光度を測定して菌の発育を測定した。

2. クエン酸の利用性の測定

(1) クエン酸ペルメアゼ活性

B. coagulans を 40°C で 48 時間の前培養を 2 回行ったのちに、グルコースブロスに 0.3% のクエン酸三ナトリウムを加えた培地に 1 v/v% の割合で添加して培養し、40°C で菌の増殖曲線における対数増殖期の大体半分の位置まで増殖させる。培養液を 9,000 rpm で連続遠心分離して菌体を集め、0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.3) で 2 回洗浄したのちに、同緩衝液に菌の乾燥重量が約 30 mg/ml となるように懸濁し、使用するまで 4°C に冷蔵した。クエン酸の利用性は HARVEY および COLLINS⁹⁾ の考案した方法によって行なった。すなわち菌体をクエン酸三ナトリウムを含む基質中に懸濁させ 30°C に一定時間保持したのちに菌体を濾過し濾液のクエン酸量を測定した。ただしクエン酸の定量法は MARIER-BOULET 法⁷⁾ (無水酢酸およびピリジンの添加による比色定量法) を使用した。

(2) 平板透明化法によるクエン酸の利用性の測定

(1) にのべた方法によって一応クエン酸の利用性を調べることができるが、より正確に確かめるために、クエン酸カルシウムを使用した平板透明化法も合わせて実施した。本法は GALESLOOT ら⁸⁾ によって考案されたものであって、ホエー寒天培地を基礎として、これにクエン酸カルシウム・カルボキシメチルセルロース (CMC) 懸濁液を加えて混濁させたのちに試料を接種して培養した場合に、クエン酸利用性の集落の周辺はクエン酸が消費されて混濁が消失し、透明環を形成することにより確認するものである。

供試 *B. coagulans* は滅菌脱脂乳を使用して 40°C で 48 時間ずつ 2 回前培養した。またホエー寒天培地としては WACCA (whey agar with calcium lactate and casamino acids) および WAC (whey agar with calcium lactate, カサミノ酸を含まない) を使用した。またクエン酸カルシウム懸濁液の調製に当たっては、45~50°C の温水で CMC の 1.5% 溶液を作り、本液 100 ml に対しクエン酸カルシウム粉末 10 g を加え、久保田製作所

KMS-250 型音波振盪機により 15 分間振盪したのちに 120°C で 10 分間滅菌した。

透明化試験の実施に当たっては 15 ml ずつ試験管に分注して滅菌した WAC または WACCA を加熱して寒天をとかし、50°C に冷却したのちにクエン酸カルシウム懸濁液を 1 ml ずつ加え、消毒したゴム栓でふたをして静かに転倒を繰り返して混合したのちにペトリ皿にあげ、生理的食塩水で洗浄後適当な濃度に希釈した *B. coagulans* を混合して 26.5, 30 または 40°C にて培養し、集落が明らかに認められたときに透明化度を観察した。

3. 牛乳培地における酸生産性試験

滅菌脱脂乳に前培養した *B. coagulans* を、63°C で 30 分間保持殺菌した脱脂乳に 10 v/v% の割合で加え、試験管に 10 ml ずつ分注し、全菌株を 50°C で培養した。2 時間ごとに 0.1 N NaOH で酸度を測定し結果は乳酸 % で示した (なお、スターターが沈降するのを防ぐために 2 時間ごとに試験管を振盪した)。

4. ヨーグルトの製造および試験

(1) 混合スターターの使用による製造

前培養した *B. coagulans* と *L. bulgaricus* を 4:1 に混合したものを、脱脂乳に 2 v/v% となるように加え、30°C で製造した。製品についてジアミノベンジジン法によりジアセチル⁹⁾ およびアセトイン¹⁰⁾ 含量を測定した。ただし試料の採取量はジアセチルでは 5 g、アセトインの場合は 2.5 g とした。また、製品のカード張力は飯尾電機(株)製 N.G.K. 規格カード張力計により測定した。

(2) *B. coagulans* を単独スターターとして使用したヨーグルトの製造

50°C で 24 時間ごとに 2 回植継いだものを使用して前培養を行なった。スターターの添加量は 10 v/v%、製造温度は 50 および 40°C に定めた。そのほかの条件は前項と同じである。

5. カテージチーズの製造実験

(1) HANSEN スターターと *B. coagulans* 混合スターターを使用した場合

殺菌脱脂乳に各菌を 24 時間ごとに 2 回植継いで前培養した。培養温度は HANSEN スターターでは 26.5°C、*B. coagulans* では 40°C とした。製造方法は慶田ら⁹⁾ の記載に従って行った。また、ホエーの酸度はカードのカッティングののちに温水を混合したものを使用して測定した。

(2) *B. coagulans* を単独スターターとして使用した場合

前培養は 50°C で滅菌脱脂乳に 24 時間ごとに 2 回植継いだ菌株を使用した。50°C 静置製造したもの、40°C で静置製造したものおよび 50°C で静かにかくはんしたもの 3 種類について比較した。製造方法は(1)と同じである⁹⁾。

実験結果ならびに考察

1. *B. coagulans* の発育度

乳酸菌の菌の対数増殖期は、菌体内の代謝系が活発に作用し、酵素活性も最高であると考えられる。そこで、本法では矢野ら¹¹⁾の報告に従って 660 m μ による吸光度 (O. D.) を測定することによって *B. coagulans* の発育度を測定した。結果は第 1 図に示すとおりである。本図より対数増殖期の中間値を各菌株の回収時刻として定めた。すなわち次のとおりである。

B. coagulans IAM 1115 培養 23 時間後

同 IAM 1146 " 20 "

同 IAM 1171 " 14 "

同 IAM 1194 " 18 "

2. クエン酸の利用性

香気生産性乳酸菌を使用した発酵乳製品における良好な風味成分としては種々のものが知られているが、そのうちもっとも重要なものはジアセチルである。ジアセチルはクエン酸よりビルビン酸を経由して生成することが知られている。この際に培地中のクエン酸を無制限に *Str. diacetylactis* の菌体内に入られる酵素系の存在することがすでに HARVEY および COLLINS⁶⁾ によって示されている。この酵素は COHEN および MONOD¹²⁾ によって明らかにされた細菌性ペルメラーゼの一種であり、クエン酸ペルメラーゼと呼ばれている。*B. coagulans* については、牛乳培地で培養するとチーズよう香気を発生するこ

とが報告されており⁸⁾、本菌においてもクエン酸ペルメラーゼが存在し、*Str. diacetylactis* と同様なアセトインとジアセチルの生成経路を有することが考えられる。この点については培地中のクエン酸の増減量を測定することによって知ることができる。クエン酸の菌体内への取入れ量の測定成績は第 1 表に示すとおりである。本表より、IAM 1115 株は $-0.02 \sim +0.30$ 、同 1146 株は $-0.05 \sim +0.62$ 、同 1171 株は $-0.07 \sim +0.07$ 、同 1194 株は $-0.06 \sim +0.06$ (いずれも $\times 10^{-6} M/ml$ 培地) の範囲内で変動していることが認められはつきりとした傾向がつかめなかった。この点についてさらに確かめるために GALESLOOT の培地 (WACCA と WAC) を使用し 40°C、6 日間、30°C、7 日間、26.5°C、7 日間培養した平板透明化法によるクエン酸の利用性の試験を行なった。その結果は各培養条件の平板とも集落が群生した時点において肉眼で観察したが透明化平板は認められなかった。なお、WAC の平板上の集落のほうが WACCA の集落よりも全般的に小さく発育が不良であったが、これはカサミノ酸の *B. coagulans* に対する発育促進効果によるものと考えられる。

以上の両実験の結果より、*B. coagulans* にはクエン酸を始源物質としてジアセチル、アセトインを生成する経路は存在しないと結論することができる。

3. 牛乳培地における酸生産性試験

B. coagulans を単独でスターターとして使用してヨーグルトを製造することの可能性を確かめるために、酸生産性試験を実施した。4 菌株における酸度 (乳酸 %) の経時変化は第 2 図に示すとおりである。本図より、50°C、の脱脂乳培地中における酸生産性にはあまり差のないことが認められる。最終酸度は 0.50~0.65% の範囲にわたり、これは pH で示すと 4.59~5.00 の範囲におさまる。

第 1 表 クエン酸ペルメラーゼによるクエン酸の吸収 (クエン酸濃度によって示す)

(単位: $10^{-6} M/ml$ 培地)

菌の種類 基質濃度	<i>B.coagulans</i> IAM 1115	<i>B.coagulans</i> IAM 1146	<i>B.coagulans</i> IAM 1171	<i>E.coagulans</i> IAM 1194
0.43	-0.05	-0.08	-0.09	-0.09
0.54	-0.08	-0.05	-0.10	+0.03
0.75	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07
1.07	-0.18	-0.07	-0.16	+0.06
2.14	-0.02	-0.14	-0.09	0
5.35	+0.30	+0.62	+0.07	-0.06

注 + : 菌体内へのクエン酸の吸収

- : 菌体よりのクエン酸の排出

第 1 図 *B. coagulans* の増殖曲線 (40°C、滅菌脱脂乳培地)

B. coagulans の発育は 50°C 付近においてもっともすみやかであるが、凝固したカードはホエーを分離して収縮することが認められた。これは第 2 図において酸度の上昇が定常期に達する時点と一致する。これに対して 40 および 30°C に培養温度を低下させた場合には、凝固したカードにホエー分離は認められず、凝固後も酸生産は停滞せずにゆっくりと増加することを確認した。

4. ヨーグルトの製造試験

通常、ヨーグルトの製造に際しては *Str. lactis*, *Str. thermophilus* または *L. bulgaricus* などをスターターとして使用し、33~35°C で 10 時間ぐらい発酵させる方法が行なわれている。また、このほかに *L. bulgaricus* の単用により 45°C で 4 時間発酵させる迅速法もある。*B. coagulans* は酸生産性が低く、単用では凝固が開始するまでは 40°C で 12 時間以上、30°C では 22 時間以上も培養しなければならないという難点がある。しかしながら *L. bulgaricus* との共生スターターを使用することにより促進されることを確認した。したがって *B. coagulans*・*L. bulgaricus* (4:1) の共生スターターの使用

第 2 図 *B. coagulans* の脱脂乳培地における酸生産性 (50°C)

により 30°C で 10 時間発酵させヨーグルトを製造した。製品の試験成績は第 2 表のとおりである。ただし *L. bulgaricus* のみを 0.4 v/v % 添加して単独スターターにより製造したものも参考までに示した。

本表より、製品の酸度は 1% 前後、カード張力は 30~36 g であって、組織的にはほとんど差がないことが認められた。また、*B. coagulans* IAM 1115, 1146, 1171 を使用した区分では対照に比較してジアセチルおよびアセトイン含量が高いにもかかわらず、不快な臭味を呈し、官能試験成績はむしろ悪いという成績がでているが、これはジアセチルとアセトイン以外の生成物質によるものと考えられる。

なお、参考のために *B. coagulans* の単用によるヨーグルトの製造も実施してみたが、50°C で発酵した場合には一夜でホエー分離およびかっ変が現われ、40°C で行なった場合には必要な硬度を得るのには 24 時間以上発酵させねばならず、しかもある程度のかっ変は避けられないことを認め、*B. coagulans* の単独スターターはヨーグルトの製造のためには不適当であると思われる。

5. カテージチーズの製造実験

ヨーグルト製造の場合と同様の理由で、現在使用されている製造条件を準用する場合には *B. coagulans* の単独使用は不適当であると判断されるので HANSEN スターターと混合して使用した。なお、対照として HANSEN スターターの単用によるものも製造した。製造後クリーム添加を行わずにカルトン詰めした製品の試験成績は第 3 表に示すとおりである。製品の収率、水分においてはとくに差は認められなかった。カテージチーズの酸度は対照に比較して一般に高く、とくに *B. coagulans* IAM 1194 を使用した製品ではこの傾向が著しかった。ジアセチルおよびアセトイン含量は対照ではそれぞれ 1.6 および 20.0 ppm であって 48 時間冷蔵しても含量はほと

第 2 表 *B. coagulans*, *L. bulgaricus* 共生スターターの使用により製造したヨーグルトの試験成績

種 類 菌株の組合せ 試験項目	<i>B. coagulans</i> 添加区				対 照 L.B.
	L.B.+B.C. IAM 1115	L.B.+B.C. IAM 1146	L.B.+B.C. IAM 1171	L.B.+B.C. IAM 1194	
酸 度 (乳酸%)	0.94	0.96	0.96	1.02	1.08
カード張力 (g)	33.0	30.8	34.0	35.8	33.0
ジアセチル (ppm)	4.6 (11.7)	5.2 (20.6)	5.2 (16.7)	2.4 (10.3)	2.6 (12.5)
アセトイン (ppm)	34.6 (88.3)	20.0 (79.4)	26.0 (83.3)	20.8 (89.7)	18.2 (87.5)
官能試験	むっとした不快な 味が口中に広がる	むっとした不快な 味が口中に広がる	むっとした不快な 味が口中に広がる	良好な風味	単純酸味

注 1. L.B.=*L. bulgaricus*, B.C.=*B. coagulans*

2. () 内はジアセチル+アセトインの総量に対する比率 (%)

第 3 表 *B. coagulans* および HANSEN スターターを
使用して製造したカテージチーズの試験成績

種 類 菌株の組合せ 試験項目	<i>B. coagulans</i> 添加区				対 照 H
	H+B.C. IAM 1115	H+B.C. IAM 1146	H+B.C. IAM 1171	H+B.C. IAM 1194	
収量 (原料乳に対する重量%)	9.6	9.9	9.6	9.6	10.2
ホエーの酸度 (乳酸%)	0.30	0.29	0.34	0.25	0.30
カードの酸度 (乳酸%)	0.90	1.12	1.09	1.38	0.85
水分 (%)	78.3	79.2	79.0	77.7	79.1
製造直後	ジアセチル (ppm)	2.8 (8.1)	2.8 (5.8)	2.8 (7.3)	2.6 (7.1)
	アセトイン (ppm)	31.6 (91.9)	45.6 (94.2)	35.6 (92.7)	34.0 (92.9)
冷蔵後 4°C 48 時間	ジアセチル (ppm)	2.8 (5.7)	3.6 (4.2)	2.6 (3.8)	2.2 (5.1)
	アセトイン (ppm)	46.0 (94.3)	82.2 (95.8)	65.2 (96.2)	40.8 (94.9)
官能試験 (48時間後)	香氣は弱い 淡白な味	強い香氣 酸味もある	強い香氣 酸味もある	香氣は弱い 酸味が強い	温和な風味

注 1. H=HANSEN スターター

2. () 内はジアセチル+アセトインの総量に対する比率 (%)

3. ホエーの酸度は温水を加えたのちに測定した

んど変化しなかった。これに対して *B. coagulans* 添加区では一般にジアセチルおよびアセトイン含量が高く、しかも冷蔵中にアセトインの増加することを認めた。とくに *B. coagulans* IAM 1146 および 1171 を使用した製品においてアセトインの増加が著しく、これらの製品では香氣も強いこととよく一致した関係を示した。

PARKER および ELLIKER¹³⁾ はカテージチーズの風味とジアセチル含量は密接な関係にあり、ジアセチルが 1.40~3.25ppm のものはすぐれた風味を示し、0.62~1.40ppm のものはややすぐれており、0.15~0.62 ppm では淡白で平板な風味を示すことを明らかにした。また HEMPENIUS¹⁴⁾ はアメリカにおいて消費者を対象として大規模なカテージチーズの嗜好調査を行なった結果、消費者は 1.4 ppm のジアセチル含量の差を官能的に識別しうることおよび 0.2~5.0 ppm の範囲ではジアセチル含量の高いものほど美味であるとして好まれることを明らかにしている。このような基準から判断してもカテージチーズのスターターとして HANSEN スターターに *B. coagulans* を併用した場合には製品の風味が向上することが示される。

B. coagulans の単独スターターの使用によるカテージチーズの製造についても検討してみたが、50°C で放置した場合には適当なカードが形成しないうちにホエーが分離してしまい、これを防止するために一定時間ごとにかきまぜをしながら発酵させたところ、酸度の上昇はすみやかであったが、形成したカードは着色しており水餅状のねばっこい製品であった。40°C に条件を変えて作

ってみた場合には色も組織もカテージチーズとしてやや満足しうるものがえられたが、官能試験の結果香氣は余り感じられなかった。なお中山¹⁵⁾ は *B. coagulans* の使用によりチーズを作ることができ、とくにカテージチーズは香味がすぐれているとのべているがこの点については注目する必要がある。

なお、最後に香氣成分をジアセチルおよびアセトインに限定して考察すると、一般に对照 (ヨーグルトでは *L. bulgaricus* 単用区、カテージチーズでは HANSEN スターター単用区) に比較して、*B. coagulans* 添加区のほうがヨーグルトではジアセチルで 2.0~2.6 ppm、アセトインで 1.8~16.4 ppm、48 時間冷蔵後のカテージチーズではそれぞれ 0.4~1.8 ppm および 16.8~58.2 ppm 高いことを認めた。このようなジアセチルおよびアセトインの増加分は *B. coagulans* に由来するものか、あるいは *L. bulgaricus* または HANSEN スターターに由来するものであるかについてはさらに検討する必要がある。

要 約

有胞子乳酸菌 *B. coagulans* の 4 菌株 (IAM 1115, 同 1146, 同 1171 および同 1194) の香氣生産性について検討した。*B. coagulans* にはくえん酸の利用性は認められなかった。*B. coagulans* を他の乳酸菌と併用した混合スターターを使用した場合には、製品の香味が改良されることを認めた。すなわちヨーグルト製造の際には *B. coagulans* IAM 1194 の併用が良好な風味を示し、カテージチーズの製造の場合には同 IAM 1146 および IAM

1171 を使用した場合に 酸味および 香気の強い製品が得られ、ジアセチルおよびアセトイン含量も対照に比較して高い値を示した。この増加が *B. coagulans* に由来するものであるか否かについてはさらに検討する必要がある。カテージチーズを 48 時間冷蔵した場合に、*B. coagulans* 添加区ではアセトインの増加が認められた。

文 献

- 1) 北原覚雄：農化，**16**，819 (1940).
- 2) 中山大樹・上野 学：農化，**26**，117 (1952).
- 3) 中山大樹：玉川大学農学部研究報告，**1**，73(1960).
- 4) 浜本 典男・金内 稔郎：雪印乳業技術研究所報告，No. 69, p. 108 (1965).
- 5) 中山大樹・小池弘子：山梨大学醗酵研究所報告，**9**，10 (1962).
- 6) HARVEY, R.J. and COLLINS, E.B.: *J. Bacteriol.*, **83**, 1005 (1962).
- 7) MARIER, J.R. and BOULET, M.: *J. Dairy Sci.*, **41**, 1683 (1958).
- 8) GALESLOOT, Th. E. et al.: *Neth. Milk & Dairy J.* **15**, 127 (1961).
- 9) 慶田雅洋・渋屋千征・津郷友吉：食品工誌，**10**，408 (1963).
- 10) 慶田雅洋・津郷友吉：食品工誌，**14**，208 (1967).
- 11) 矢野信礼・入江良三郎・森地敏樹・見坊 寛：農化，**36**，747 (1962).
- 12) COHEN, G.N. and MONOD, J.: *Bacteriol Revs.* **21**, 169 (1957).
- 13) PARKER, R.B. and ELLIKER, P.R.: *J. Dairy Sci.* **36**, 843 (1953).
- 14) HEMPENIUS, W.L. et al.: *J. Dairy Sci.*, **48**, 870 (1965).
- 15) 北原覚雄：乳酸菌の研究，初版（東大出版会），p. 502 (1966). (1969 年 7 月 21 日受理)