

# 醗酵食品の製造に関する乳酸菌（第4報）

すぐき漬中の乳酸菌と酵母の栄養要求

岩井 正憲・今原 広次・中浜 敏雄

MASANORI IWAI, HIROTSUGU IMAHARA and TOSHIO NAKAHAMA:

Halophilic lactic acid bacteria in fermentation food making. (IV). Nutrient requirement of lactic acid bacteria and yeasts in suguki making.

要旨：すぐき漬より酵母の分離を行ない乳酸菌，酵母添加による熟成効果について検討し，乳酸菌，酵母がすぐき漬製造中に盛んに生育するのは，その環境がこれら微生物にとって特によい条件にあり，この見地からすぐき菜にはある特殊な成分の存在も推察されるので，乳酸菌，酵母の栄養要求について検討した。

分離された有用酵母は同定の結果 *Saccharomyces rouxii* であり，乳酸菌，酵母の添加では，乳酸菌単独添加より熟成が早く良好な製品が得られた。

乳酸菌，酵母の栄養要求の結果では，前者はビタミンとしてピリドキシン，ニコチン酸，パントテン酸，PABA およびビオチンを，アミノ酸はプロリン以外の17種を要求した。後者はビタミンのみを要求し，窒素源が硫安のときはチアミン，ピリドキシン，ニコチン酸およびビオチンを，アミノ酸のときは上記の他にパントテン酸の要求性が付加されるのを認めた。

## I. 緒 言

すぐき漬の製造には前報<sup>1)</sup>で分離した乳酸菌とともに，酵母の存在が考えられる。小川ら<sup>2)</sup>は福神漬より，小崎はべつたら漬<sup>3)</sup>，たくあん漬<sup>4)</sup>より，また Etchells ら<sup>5)</sup>は塩蔵きうりより酵母の分離を行なっている。本報においては，すぐき熟成におよぼす乳酸菌，酵母の意義を検討するため前報<sup>1)</sup>で分離した乳酸菌と本報で新たに分離した酵母を用い，その添加による熟成効果を検討した。

乳酸菌，酵母がすぐき漬の製造中に盛んに生育するのは，その環境がこれら微生物にとって特に好適な環境にあるからで，この見地からすぐき菜に含有される特殊な成分の存在も推察することは不可能ではない。乳酸菌，酵母に対するアミノ酸，ビタミン要求についてはすでに多くの報告がある。たとえば乳酸菌については Rogosa<sup>6), 7)</sup>が *Lactobacillus* 属に包括される菌種とその栄養要求に関して系統的な研究を行ない。宮沢<sup>8)</sup>も *Lactobacillus fermenti* 36 のビタミン要求について，また矢野ら<sup>9), 10)</sup>は乳業用乳酸菌の栄養要求について報告している。酵母については高橋<sup>11-13)</sup>の窒素

源をアミノ酸，無機窒素としたときのビタミン要求の有無などの報告がある。そこですぐき漬製造中より分離した乳酸菌，酵母についてまずこの点より検討を行なった。

## II. 実験方法

1. 酵母の分離 前報<sup>1)</sup>と同様の分離試料より，常法にしたがって酵母の分離を行ない。同一株と認められるものは整理して GY-1, GY-2 をえたが，とくに熟成に関与すると考えられる GY-1 につき Lodder<sup>14)</sup>らの方法によりその同定を行なった。
2. 乳酸菌，酵母添加試験と一般分析 添加試験は前報<sup>1)</sup>に準じて行なった。すなわち乳酸菌単独のものは1樽に乾燥重量として約500mgの菌体を水に懸濁して均一に散布し，酵母併用の際は上述の懸濁液に酵母を乾燥重量として約100mg混合したものを散布した。また原料，対照区および試験区の一般分析は常法<sup>11), 12)</sup>により行なった。
3. 乳酸菌，酵母の栄養要求 培地については一部修正したが，乳酸菌は矢野<sup>9), 10)</sup>ら，酵母は高橋<sup>11), 12)</sup>の方法に準じて行なった。

### Ⅲ. 実験結果および考察

1. 酵母の撰択と同定 分離した2株につき耐塩性、耐乳酸性および耐アルコール性を検討した結果、いずれも GY-1 がすぐれており、また最適温度としては GY-1 が30°C、GY-2 が20°C でこの点からも前者が原料の熟成により効果的であると推定されたのでこの菌株を添加試験に使用することにした。

Table 1 に示したごとく GY-1 は孢子を形成し、栄養細胞が卵形で、出芽法で増殖し、液体培養で膜を形成せず、劃線培養では淡黄白色のクリーム状を呈し、醗酵力が強く、硝酸塩を資化しないことから *Saccharomyces* 属であり、糖の醗酵性、資化性などから *Saccharomyces rouxii* と同定した。

2. 乳酸菌、酵母添加による熟成試験 Table 2 に示した製品の一般分析の結果で明らかのように、乳酸菌、酵母を併用したものは、無添加のものに比較して、乳酸菌単独のものと同様、乳酸の量は大きくなっている。またアルコールは酵母併用によって増加してい

るが、逆に還元糖は減少している。そして前報<sup>1)</sup>同様の構成員で試食した結果は、すぐき漬の熟成度が著しく強く、さらに酸味強く、特有の風味にすぐれていた。しかし熟成度が著しく強いことが反面欠点としてもあらわれ、特に根部が少し柔らかくなる傾向があった。そこで酵母併用の際は室漬の期間の再検討が必要であることを推察し、室漬の期間の短縮によるすぐき漬製造を試みた。

その速成すぐき漬試験による製品の一般分析の結果を Table 3 に示す。

このうち乳酸菌、酵母併用のものは室漬期間4日、乳酸菌単独のものおよび対照区は5日である。乳酸の生成量は室漬期間に関係なく、添加区は対照区より多く、酵母併用の場合は室漬期間の短縮により Table 2 の結果より還元糖の減少が少なくなっている。そして官能試験の結果では根部がやや柔らかくなるという欠点も解消され、熟成度、酸味、風味ともすぐれた製品をうる事が出来た。この結果より乳酸菌、酵母併用により室漬期間が短縮出来ることがわかった。

Table 1 Taxonomical properties of GY-1 strain

Cell	Oval (1.0~4.0×1.5~5.0μ)
Sporulation	+
Growth temperature	Optimum 30°C, Upper limit 40°C
pH	Good growth on 4.8 not on lower 2.5
Film formation	-
Yeast ring formation	±
Gelatine liquefaction	-
Assimilation of nitrate	-
Assimilation of ethanol	-
Fermentation	Glucose + Maltose ± Galactose - Lactose - Saccharose -
Sugar assimilation	Glucose + Maltose + Galactose + Lactose - Saccharose +

Table 2 Analytical data of suguki

	Added lactic acid bacteria		Added lactic acid bacteria and yeast		Non added		Raw material	
	Radish	Leaf	Radish	Leaf	Radish	Leaf	Radish	Leaf
Water	88.3	78.6	88.2	78.9	88.5	79.1	94.6	89.2
Reducing sugar	5.0	3.3	4.1	2.4	5.3	3.5	1.7	1.8
Total sugar	5.7	4.6	5.0	4.4	5.9	4.7	3.0	2.8
Total acid	0.9	1.1	1.0	1.3	0.6	1.0	0.2	0.3
Lactic acid	0.7	1.0	0.8	1.0	0.4	0.8	0.1	0.2
Volatile acid	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Soluble nitrogen	0.3	0.5	0.4	0.6	0.3	0.5	0.1	0.3
Ethanol	0.5	0.2	0.7	0.6	0.4	0.3	0.0	0.0
Sodium chloride	2.6	3.2	3.0	3.4	2.8	3.0	0.4	0.7

5 days incubation

## 3. 乳酸菌, 酵母の栄養要求

A. 乳酸菌の栄養要求 基本培地は矢野<sup>9), 10)</sup>らに準じ, 緩衝剤は試験の結果0.05M酢酸ソーダの場合が良好であったので Table 4のごとくにした。

Table 4の基本培地をもとに *L. plantarum* の栄

養要求をオMISSIONテストにより行なった結果を Table 5に示す。

Table 5に示したごとく本菌株はビタミンとしてニコチン酸およびパントテン酸を強く要求し, ピリドキシンもかなりの要求性を示した。アミノ酸については

Table 3 Analytical data of suguki

	Added lactic acid bacteria		Added lactic acid* bacteria and yeast		Non added		Raw material	
	Radish	Leaf	Radish	Leaf	Radish	Leaf	Radish	Leaf
Water	85.1	76.4	84.2	78.2	84.6	79.2	94.6	89.2
Reducing sugar	5.0	3.4	4.8	2.9	5.4	3.6	1.7	1.8
Total sugar	5.8	4.7	5.7	4.7	6.2	5.2	3.0	2.8
Total acid	0.9	1.2	0.9	1.3	0.8	1.1	0.2	0.3
Lactic acid	0.6	0.9	0.5	0.9	0.5	0.7	0.1	0.2
Volatile acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Soluble nitrogen	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3
Ethanol	0.6	0.5	0.7	0.6	0.5	0.5	0.0	0.0
Sodium chloride	3.0	3.7	3.4	3.6	3.0	3.7	0.4	0.7

5 days incubation \* 4 days incubation

Table 4 Basal synthetic medium of *L. plantarum*

Glucose	1g	Thiamine·HCl	20γ	L-Ala	20mg	L-Phe	10mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 ♪	Riboflavin	40 ♪	L-Arg·HCl	20 ♪	L-Ser	10 ♪
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 ♪	Pyridoxine·HCl	20 ♪	L-Asp	40 ♪	L-Thr	20 ♪
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20mg	Ca-Pantothenate	40 ♪	L-Cys	10 ♪	L-Try	10 ♪
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1 ♪	PABA	20 ♪	L-Glu	40 ♪	L-Tyr	10 ♪
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 ♪	Nicotinamide	40 ♪	L-His·HCl	10 ♪	L-Val	20 ♪
Adenine·H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ♪	Folic acid	0.2 ♪	L-Ileu	20 ♪	L-Lys·HCl	20 ♪
Guanine·HCl	1 ♪	Biotin	0.2 ♪	L-Leu	10 ♪	L-Pro	10 ♪
Uracil	1 ♪	Na-Acetate	0.68g	L-Met	10 ♪	Gly	10 ♪
Xanthine	1 ♪						

per 100ml, pH 7.0

Table 5 Vitamins, Amino acids and Nucleic acid bases requirements of *L. plantarum*

Eliminated substance	Growth	Eliminated substance	Growth	Eliminated substance	Growth
Thiamine·HCl	93	L-Ser	69	L-Glu	3
Riboflavin	100	L-Leu	26	L-Cys	2
Pyridoxine·HCl	58	L-Ala	23	L-Arg·HCl	2
Nicotinamide	6	L-Ileu	20	L-Val	2
Ca-Pantothenate	8	L-His·HCl	18	L-Tyr	1
PABA	92	L-Met	18	L-Try	1
Folic acid	100	L-Lys·HCl	16	Adenine·H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100
Biotin	90	L-Phe	9	Guanine·HCl	100
L-Pro	100	L-Thr	8	Uracil	96
Gly	73	L-Asp	3	Xanthine	100

Growth was expressed by  $\frac{\text{O.D. in tested medium}}{\text{O.D. in basal synthetic medium}} \times 100$

Wave length: 660mμ Incubation: 30°C, 40hrs

プロリン以外の17種について要求性の強弱はあるが要求性を示した。また核酸塩基については40時間培養では存在しなくても差はないが、20時間培養では生育に差があり、生育の立ち上りに関係があると考えられる。そこで、本菌株の最少培地を決定する目的で要求性の少ないものを除いて培地を作製した。すなわち Table 5 より 90 以上の生育を示すものを除いた培地を作製し、生育をみたが殆んど生育を示さなかった。ところ

がこれに PABA (パラアミノ安息香酸)、ビオチンを添加すると良好な生育を示した。PABA は葉酸と代替出来るのでオMISSIONテストで要求を示さなかったものである。

B. 酵母の栄養要求 高橋<sup>11-13)</sup>によれば酵母の増殖においてビタミンの要求は窒素源の種類により、また酵母の種類により異なる。すなわち酵母群を大別して、窒素源としてアミノ酸が存在すれば正常な繁殖を示すものとアミノ酸が存在してもビタミンが存在しなければ繁殖しないものがある。また窒素源を無機窒素でおきかえる場合、ビタミンを要求するものとしな

いものがあるとしている。そこで合成培地を決定する前段階として Table 6 に示す 8 種類の組成の培地を作り酵母を接種して生育をみた。

Table 6 Composition of culture medium on the growth of *S. rouxii*

Culture medium	Growth
1. Glucose+Salts+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +Vitamins	100
2. Glucose+Salts+Amino acids+Vitamins	95
3. Glucose+Salts+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6
4. Glucose+Salts+Amino acids	6
5. Glucose+Salts+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +Purine, Pyrimidine bases	5
6. Glucose+Salts+Amino acids+Purine Pyrimidine bases	4
7. Glucose+Salts+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +Purine, Pyrimidine bases+Vitamins	100
8. Glucose+Salts+Amino acids+Purine, Pyrimidine bases+Vitamins	97

Growth was expressed by  $\frac{\text{O.D. in tested medium}}{\text{O.D. in No. 1 culture medium}} \times 100$

Wave length: 660m $\mu$  Incubation: 30°C, 40hrs

Table 7 Basal synthetic medium of *S. rouxii*

Glucose	5g	Thiamine·HCl	0.1mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1%	Riboflavin	0.1%
KCl	85mg	Pyridoxine·HCl	0.1%
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.5mg	Ca-Pantothenate	0.1%
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25%	Nicotinamide	0.1%
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5%	PABA	20 $\gamma$
Na-Citrate	0.3g	Folic acid	1%
Citric acid	50mg	Biotin	1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.3g		

per 100ml

Table 8 Vitamins requirements of *S. rouxii*

Eliminated vitamin	Growth	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Nitrogen source)	Amino acids (Nitrogen source)
Thiamine·HCl	48	77
Riboflavin	103	100
Pyridoxine·HCl	21	64
Ca-Pantothenate	95	72
Nicotinamide	4	5
PABA	97	98
Folic acid	101	100
Biotin	37	92

Growth was expressed by  $\frac{\text{O.D. in tested medium}}{\text{O.D. in basal synthetic medium}} \times 100$

Wave length: 660m $\mu$  Incubation: 30°C, 40hrs

Table 6 の結果において明らかなように、この酵母はアミノ酸、無機窒素のいずれを窒素源とする場合も、ビタミンを要求することが指摘される。この結果から Table 7 に示すような培地を作った。

次に Table 7 の培地をもとにオMISSIONテストを行ないビタミン要求について検討した。

Table 8 に示すようにこの酵母はニコチン酸を強く要求し、またピリドキシンおよびチアミンを要求することが認められる。ビオチンの要求は窒素源が硫安のとき著しく、パントテン酸の要求は窒素源としてアミノ酸が用いられたとき強いことを示している。結局窒素源が硫安の場合はビタミンとしてニコチン酸、チアミン、ピリドキシンおよびビオチンを、またアミノ酸の場合はニコチン酸、チアミン、ピリドキシン、パントテン酸およびビオチンを添加すれば正常な生育を示した。

## 文 献

- 1) 岩井正憲・今原広次・万雄治・中浜敏雄 (1965) : 醸工, **43** : 791.
- 2) 小川敏男・浅見利造 (1955) : 農産技研誌, **2** : 1.
- 3) 小崎道雄 (1959) : 農化講演要旨53.
- 4) 小崎道雄 (1961) : 農化講演要旨65.
- 5) Etchell J.L. & T.A. Bell(1950): Food Technol., **4** : 77.
- 6) Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchell, A. & M. N. Disraely (1947): J. Bact., **54** : 13.
- 7) Rogosa, M., Tittsler R.P. & D. S. Geid (1953): J. Bact., **65** : 681.
- 8) 宮沢滋 (1956) : 農化, **30** : 799.
- 9) 矢野信礼・入江良三郎・森地敏樹・見坊寛(1962) : 農化, **36** : 747.
- 10) 矢野信礼・入江良三郎・森地敏樹・見坊寛(1962) : 農化, **36** : 750.
- 11) 高橋雅弘 (1954) : 農化, **28** : 395.
- 12) 高橋雅弘 (1954) : 農化, **28** : 396.
- 13) 高橋雅弘 (1954) : 農化, **28** : 425.
- 14) 高橋雅弘 (1956) : 農化, **30** : 140.
- 15) 高橋雅弘 (1956) : 農化, **30** : 145.
- 16) 高橋雅弘 (1959) : 農化, **33** : 23.
- 17) 高橋雅弘・都河竜一郎 (1959) : 農化, **33** : 83.
- 18) 高橋雅弘 (1960) : 農化, **34** : 83.
- 19) 高橋雅弘 (1960) : 農化, **34** : 699.
- 20) Lodder, J. & N. J. W. Kreger-vanRij (1952) : The Yeasts a Taxomic Study.
- 21) 京大農化編 (1957) : 新改版農芸化学実験書第二卷, 産業図書.
- 22) 山田正一 (1948) : 改訂醸造分析法, 産業図書.

## Summary

A useful yeast was isolated from the Suguki making material and the curing effect was studied in addition of lactic acid bacteria and yeast. The excellent growth of lactic acid bacteria and yeast in Suguki making is caused by the condition which is especially favorable for the growth of microorganisms and we expected that some special factor was presented in *Brassica Rapa*, L. Therefore we studied the nutritive requirement of lactic acid bacteria and yeast.

On the result of identification of the yeast, we found that this strain belongs to *Saccharomyces*

*rouxii* and the curing effect was more superior in addition of both lactic acid bacteria and yeast than lactic acid bacteria only.

In the study on the nutritive requirement of lactic acid and yeast, the former required vitamins such as pyridoxine, nicotinic acid, pantothenic acid, PABA and biotin and 17 kinds of amino acid excepted proline, the latter only vitamins and in ammonium sulfate of nitrogen source, thiamine, pyridoxine and nicotinic acid were required and in amino acid, pantothenic acid was required.