

Lactobacillus bulgaricus と *Streptococcus thermophilus* の共生作用におよぼす脱脂乳の加熱の影響

菊地 政則*・山口加代子*・松井 幸夫*

The Influence of Heating Milk on the Symbiotic Relationships of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*

Masanori KIKUCHI*, Kayoko YAMAGUCHI*
and Yukio MATSUI*

(May, 1984)

緒 論

ヨーグルトスターターに使用される *Lactobacillus bulgaricus* と高温性の乳酸球菌 *Streptococcus thermophilus* の間には共生作用があり、混合培養することによって著しく乳酸の生成が助長されることが知られている。

Pette と Lolkema⁷⁾ は *L. bulgaricus* の乳蛋白質分解作用によって生じたバリンが *S. thermophilus* の発育の助長成分であろうとしている。また、Bautista ら¹⁾ は *S. thermophilus* に対して発育促進効果をしめす物質はヒスチジンとグリシンの2種であるとしているが、東尾ら³⁾ は *L. bulgaricus* の牛乳タンパク質分解作用によって生じたバリン、ヒスチジン、メチオニン、グルタミン酸、ロイシンの5種のアミノ酸によって効果があると報告している。

一方、*S. thermophilus* の生成物質が *L. bulgaricus* の生育、酸生成を促進することも報告されている。すなわち、Galesloot ら²⁾、Veringa ら¹⁰⁾ はギ酸が *L. bulgaricus* の発育を促進するとし、東尾ら⁴⁾ は *S. thermophilus* によって生産されるギ酸とピルビン酸であることを認めた。また、鈴木⁸⁾ は *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の共生関係において、*L. bulgaricus* はギ酸で生育が促進され、しかもギ酸は *L. bulgaricus* の RNA, DNA のアデニン、グアニンに移行し、細胞の分裂に関与することを明らかにした。しかし、Pett と Lolkema⁶⁾、Bautista ら¹⁾ は *L. bulgaricus* に対し、*S. thermophilus* は発育促進効果のな

* 酪農学科，酪農微生物学研究室

Laboratory of Dairy Microbiology, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

いことを報告している。

このように *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* との共生関係は研究者によって、あるいは使用した菌株によって異なること、また *L. bulgaricus* の正常発育、乳酸生成が培地となる脱脂乳の加熱の程度によっても異なることから、本報告では特に脱脂乳の加熱と共生作用との関係を明らかにしたものである。

材料および方法

1. 供試菌株

本実験に使用した菌株は、酪農学園大学、酪農微生物学研究室に保存してある *L. bulgaricus* 2139, *S. thermophilus* 2137 である。両菌株は10%還元脱脂乳に1%になるように接種し37°C、14~16時間培養で植え継ぎをくり返し保存した。

2. 培養

10%還元脱脂乳を500 mlの三角フラスコに入れ、それぞれ恒温槽で80°C—10分間、蒸気釜で100°C—10分間、およびオートクレーブで120°C—5分間の加熱を行い、スターターは37°Cで16時間培養したものを1%になるように接種し、42°Cで本培養を行った。ギ酸の添加効果試験にはギ酸ナトリウムを殺菌脱脂乳に無菌的に添加した。

3. 生菌数の測定

L. bulgaricus の生菌数測定には常法通り希釈平板法を用いた。ブリックス寒天培地(栄研)で混釈平板を作成したのち、1%滅菌寒天を重層後、37°Cで3日間培養し形成コロニー数から生菌数を求めた。

4. ギ酸の定量法

ギ酸の定量は塩化第二水銀法⁵⁾によった。すなわち培養脱脂乳を2N HClでpHを4.6としたのち、5,000 rpmの遠心分離によってカゼインを除去し、上清液100 mlを水蒸気蒸溜によって溜液が1,000 mlになるまで捕集した。捕集液はロータリエバポレーターで約10倍に濃縮したのち、この濃縮液に10% CH₃COONa 10ml, 10% HCl 2ml, 6.5% HgCl₂ 25 mlを添加し温湯中で2時間加温、放冷後、重量既知のガラスフィルター(G4)で濾別、残留する塩化第一水銀を秤量、 $\text{HCOOH (mg)} = \text{HgCl (mg)} \times 0.0975$ の式からギ酸の量を求めた。

5. 生育促進効果の判定

生育促進効果は生菌数の増加あるいは乳酸生成量(滴定酸度)で判定した。

結 果

1. 培地加熱温度と酸の生成

L. bulgaricus 2139 株 と *S. thermophilus* 2137 株の単独および混合培養時における酸生成量を加熱温度別にみたのが Fig. 1 である。80°C—10 分間加熱乳では単独培養，混合培養の間に酸生成量の差はなく，混合培養による共生作用の効果は認められなかった。加温温度が 100°C—10 分間の場合，*S. thermophilus* 2137 株，*L. bulgaricus* 2139 株の単独では酸の生成は助長されなかったが，それらの菌株の混合培養時には著しく酸の生成が高められ，いわゆる共生作用が顕著にみとめられた。さらに 120°C—5 分間加熱乳では，*L. bulgaricus* 2139 株を単独培養した場合にも酸の生成が著しく高められ，培養 6 時間以降は混合培養と同等の乳酸生成量となった。

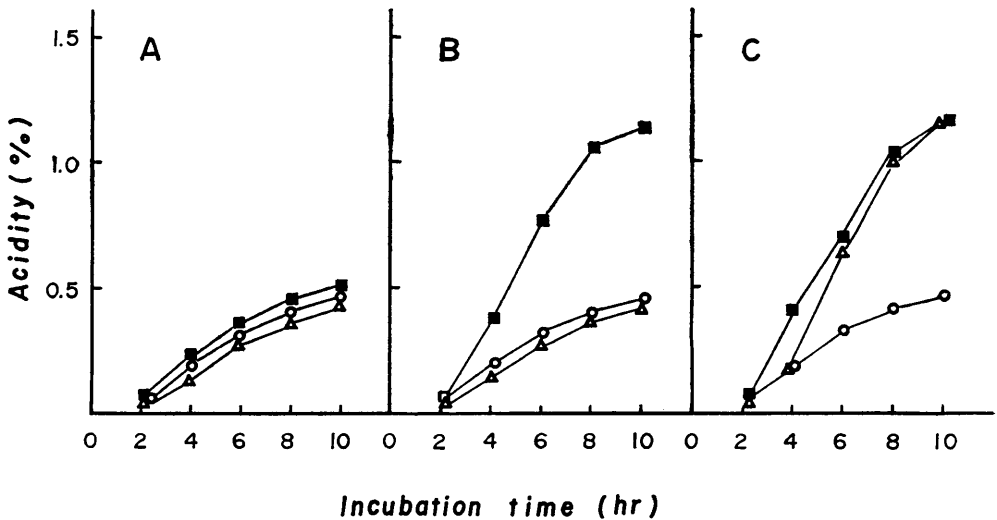


Fig. 1. Symbiotic relationship between *L. bulgaricus* 2139 and *S. thermophilus* 2137 in skim milk heated at different temperatures.

Culture condition: 10% non-fat reconstituted milk was used as media. Combined cultures were prepared by using 1.0% inoculum of each of the two strains. For single cultures, 2% inoculum was used.

- A: Preheat-treatment, 80°C-10 min.
- B: Preheat-treatment, 100°C-10 min.
- C: Preheat-treatment, 120°C-5 min.
- : *S. thermophilus* 2137
- △—: *L. bulgaricus* 2139
- : Mixed culture

2. 加熱時間と酸の生成

先の実験で培地処理温度の高いものほど、*L. bulgaricus* 2139 株の酸生成は助長されたが、ここでは 100°C 加熱処理の時間の影響について調べた。*L. bulgaricus* 2139 株単独では Fig. 2 にみられるように処理時間が長くなるにつれて酸生成が助長された。しかし、*L. bulgaricus* 2139 株と *S. thermophilus* 2137 株の混合培養においては、Fig. 3 にしめしたように、100°C—10 分間処理では酸生成は少なかったが、20 分以上の加熱処理ではきわめて高い酸生成が得られ、*L. bulgaricus* 2139 株と *S. thermophilus* 2137 株との混合培養による共生作用が認められた。

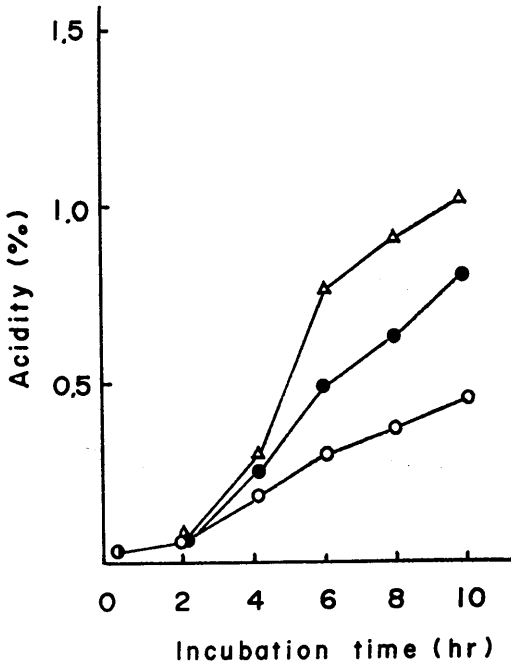


Fig. 2. Effect of different heat treatments of skim milk on souring milk by *L. bulgaricus* 2139.

Preheat-treatment: —○— 100°C-10 min.
 —●— 100°C-20 min.
 —△— 100°C-30 min.

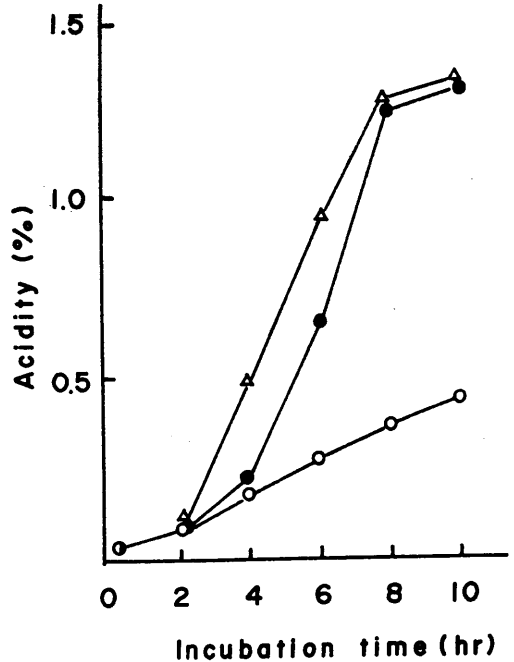


Fig. 3. Effect of different heat treatments of skim milk in acid production by mixed cultures of *L. bulgaricus* 2139 and *S. thermophilus* 2137.

Preheat-treatment: —○— 100°C-10 min.
 —●— 100°C-20 min.
 —△— 100°C-30 min.

3. 水蒸気蒸溜液が *L. bulgaricus* 2139 株の酸生成、発育におよぼす影響

脱脂乳を 80°, 100°, 120°C の各温度で加熱処理し、それを水蒸気蒸溜した溜液で 10% 還元脱脂乳を調製した際の酸生成は Fig. 4 に示したように未加熱、80°, 100°C 加熱に比べ、120°C 加熱のものは約 1.8 倍の乳酸を生成した。その時の生菌数の推移も Fig. 5 にみられ

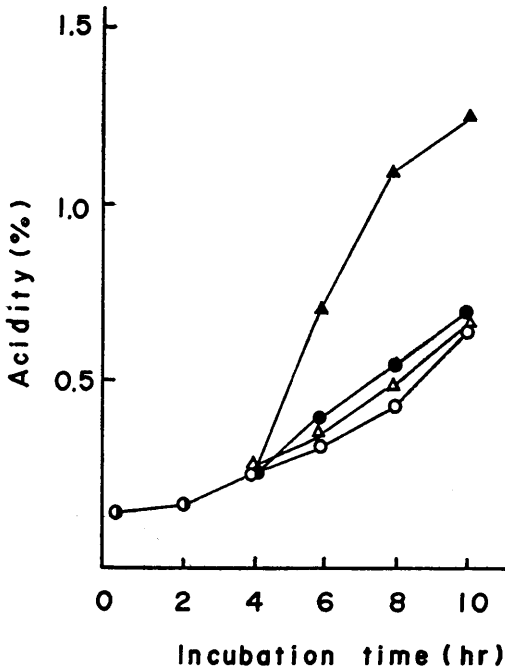


Fig. 4. Stimulation of developed acidity by *L. bulgaricus* 2139 in the addition to steam-distillate from heat-treated skim milk.

Preheat-treatment : —○— Unheated.
 —△— 80°C-10 min.
 —●— 100°C-10 min.
 —▲— 120°C-5 min.

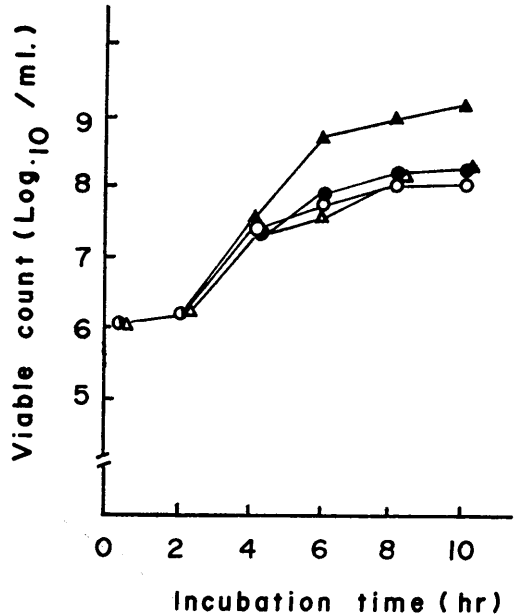


Fig. 5. Stimulation of the growth of *L. bulgaricus* 2139 by addition of steam-distillate from heat-treated skim milk.

Preheat-treatment : —○— Unheated.
 —△— 80°C-10 min.
 —●— 100°C-15 min.
 —▲— 120°C-5 min.

るように 120°C—5 分間加熱処理乳から調製した水蒸気蒸溜液を添加した脱脂乳では未加熱のものに比べ約 10 倍の生菌数となり、高温加熱処理乳は酸生成ならびに菌の増殖に大きく関与していることが明らかとなった。

4. 加熱処理乳中のギ酸生成量

加熱処理乳中に存在するギ酸の量ならびに、それらの処理乳に *S. thermophilus* 2137 株を 12 時間培養した後のギ酸の生成蓄積量を調べた。その結果、Table 1 に示したように未加熱のものではギ酸量が 1.7 ppm であったが、処理温度の上昇にしたがい、その生成量は多くなり、120°C—5 分間処理乳では 26 ppm となった。また、それらの処理乳に *S. thermophilus* 2137 株を培養すると、いずれもギ酸の生成量が高まるところから、脱脂乳を加熱することによってギ酸が生成されると同時に、*S. thermophilus* 2137 株みずからもギ酸を生成することが明らかとなった。

Table 1. Formic acid production by *S. thermophilus* in skim milk heated at different temperature

Treatment	Incubation time (hr)	
	0	12
	Formate concentration (ppm)	
Unheated	1.7	—
80°C, 10 min.	2.7	4.5
100°C, 10 min.	6.3	9.1
120°C, 5 min.	26.0	38.7

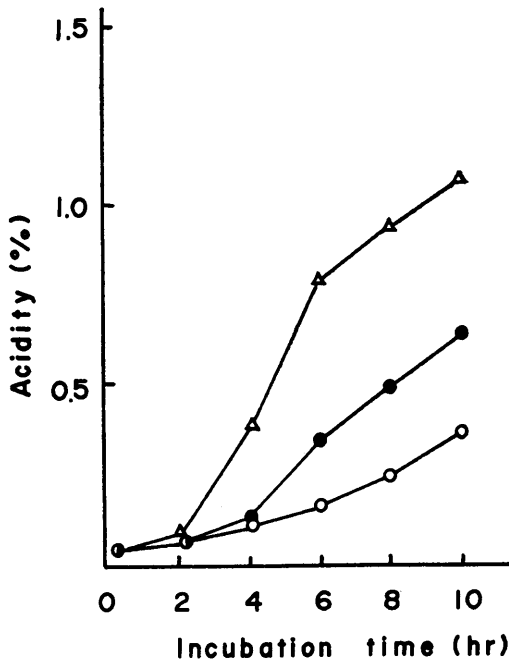


Fig. 6. Effect of sodium formate on acid production of *L. bulgaricus* 2139.

Sodium formate (ppm): —○— Non
 —●— 10 ppm
 —△— 20 ppm

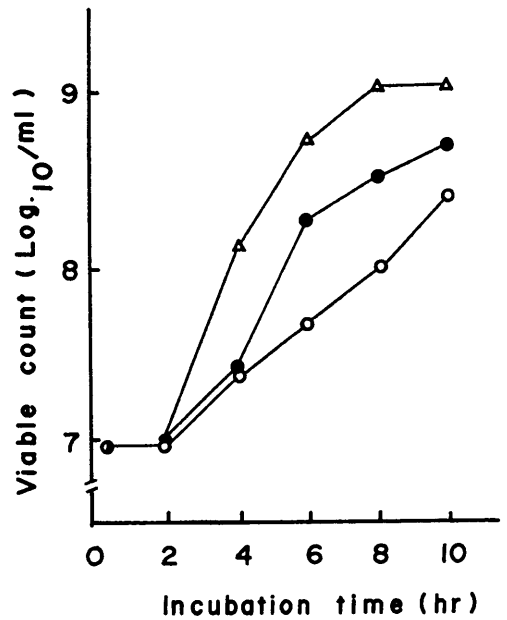


Fig. 7. Stimulation of the growth of *L. bulgaricus* 2139 by adding sodium formate.

Sodium formate (ppm): —○— Non
 —●— 10 ppm
 —△— 20 ppm

5. ギ酸添加が乳酸の生成と菌の増殖におよぼす影響

加熱処理中にはギ酸が生成され、さらにその処理乳で *S. thermophilus* 2137 株を培養するとギ酸の蓄積が助長されることから、80°C—10 分間加熱処理乳にギ酸ナトリウムを添加し、*L. bulgaricus* 2139 株の発育、酸生成量にあたる影響について検討した。

Fig. 6 はギ酸ナトリウム添加による *L. bulgaricus* 2139 株の酸生成の影響についてみたものであるが、20 ppm のギ酸ナトリウムの添加によって酸生成量は無添加のものと比較し約 2.7 倍に助長された。また、その時の生菌数も Fig. 7 にみられるように無添加に比べ約 10 倍増となった。

これらの結果から *L. bulgaricus* 2139 株の細胞増殖、酸の生成は、その培地である脱脂乳を高温処理することにより生じるギ酸と、*S. thermophilus* 2137 株の生成するギ酸の両者により助長されていることが明らかとなった。

考 察

L. bulgaricus と *S. thermophilus* の混合培養には一般に共生作用が認められるという報告が多い^{2,8,10)}。しかし、逆に *S. thermophilus* は *L. bulgaricus* の酸生成を助長しないという報告もみられる^{1,6)}。このように共生作用に関し、その見解が異なるのは、それぞれの菌株の特性によるものであろうと考えられるが、いっぽう *S. thermophilus* の生成するギ酸の量も大きく関与するものと推察される。

Veringa¹⁰⁾ は *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の混合培養において、*S. thermophilus* は *L. bulgaricus* に対しギ酸を供給する役割を果たしていると報告している。しかし、Galestoot²⁾ は *S. thermophilus* のギ酸生成量は菌株や培養条件によって異なり、*L. bulgaricus* の正常な発育、酸生成を助長するのに必ずしも十分な量でないとしている。つまり、*S. thermophilus* はギ酸を生成し *L. bulgaricus* の発育ならびに酸の生成に関与するとされているが、共生作用の有無はギ酸の量により左右されるものと考えられる。

今回実験に使用した *S. thermophilus* 2137 株と *L. bulgaricus* 2139 株とでは、80°C—10 分間処理乳においては共生作用がなく、100°C—10 分間の加熱処理乳の場合、単独培養では酸生成の助長がみられないのに対し、混合培養のものは著しく酸生成を助長した。

さらに、120°C の高温加熱処理したものにおいては *L. bulgaricus* 単独のものでも混合培養と同量の酸生成が認められた。これは Veringa¹⁰⁾ が報告したようにオートクレーブ滅菌乳に *L. bulgaricus* を培養すると、*S. thermophilus* を混合培養したのと同じように酸の生成が向上するという報告に一致した。したがって、低温加熱処理乳には *L. bulgaricus* の発育、酸生成に必要な十分なギ酸は存在しないが、*S. thermophilus* と混合培養すると *S. thermophilus* の生成するギ酸と、加熱処理によって生成されるギ酸の相乗効果によって *L. bulgaricus* の酸生成、発育が促進されるものと考えられる。

鈴木^{8,9)} は *L. bulgaricus* は殺菌牛乳中では細胞が異常伸長し正常な細胞分裂ができないが、これにギ酸を添加すると菌の伸長も正常となって細胞分裂が可能であるとしている。

これらのことから、ヨーグルトスタータとして用いる *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の混合培養における共生作用の発現には、*S. thermophilus* のギ酸の生成量に大きく関与することが明らかとなった。また牛乳の加熱処理温度とギ酸の生成に深い関係があることから、*L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の共生作用を論じる際にはこの点についても十分考えなければならない。

要 約

ヨーグルトスタータに用いる *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* は混合培養することによって酸生成を促進するいわゆる、共生作用をしめすことが知られている。

本研究は *L. bulgaricus* と *S. thermophilus* の共生作用におよぼす牛乳の加熱の影響について検討した。その結果、*L. bulgaricus* 2139 株の酸生成は脱脂乳の加熱温度が高く、時間が長いものほど助長された。120°C—5 分間加熱の脱脂乳には 26 ppm のギ酸が生成されたが、100°C—10 分間で 6.3 ppm、80°C—10 分間ではその量が 2.7 ppm であった。*L. bulgaricus* 2139 株と *S. thermophilus* 2137 株の混合培養における酸生成は培地の加熱時間が長くなることによって助長された。さらに 80°C—10 分間の加熱乳に *S. thermophilus* 2137 株を 12 時間培養したものでは 4.5 ppm のギ酸が生成されたのに対し、120°C—5 分間加熱乳では 38.7 ppm の蓄積がみとめられた。また 80°C—10 分間加熱乳に 20 ppm のギ酸ナトリウムを添加すると *L. bulgaricus* 2139 株の酸生成は無添加のものに比べ 2.7 倍となり、生菌数も 10 倍増であった。

これらのことから、*L. bulgaricus* 2139 株は牛乳の加熱処理によって生じるギ酸と *S. thermophilus* 2137 株の生成するギ酸の両者を利用し酸の生成、増殖性を高めるものと思われる。

文 献

- 1) Bautista, E. S., R. S. Dahiya and M. L. Speck, 1966. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J. Dairy Res.*, **33**: 299-307.
- 2) Galesloot, T. E., F. Hassing and H. A. Veringa, 1968. Symbiosis in yoghurt (1). Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk and Dairy J.*, **22**: 50-63.
- 3) 東尾侃二・吉岡八州男・菊池俊彦, 1977. *Lactobacillus bulgaricus* の産生する *Streptococcus thermophilus* 発育促進物質の分離および同定. 農化, **51**: 203-208.
- 4) 東尾侃二・吉岡八州男・菊池俊彦, 1977. *Streptococcus thermophilus* の産生する *Lactobacillus bulgaricus* 発育促進物質の分離および同定. 農化, **51**: 209-215.
- 5) 日本薬学会編, 1973. 衛生試験法注解. 金原出版, 195-196.

- 6) Pette, J. W. and H. Lolkema, 1950. Yoghurt 1. Symbiose en antibiose in mengcultures van *Lb. bulgaricus* en *Sc. thermophilus*. Neth. Milk and Dairy J., 4: 197-208.
- 7) Pette, J. W. and H. Lolkema, 1950. Yoghurt. Groeifactoren voor *Sc. thermophilus*. Neth. Milk and Dairy J., 4: 209-224.
- 8) 鈴木一郎, 1975. ブルガリア菌の生育とキ酸の関係. 畜産試験場年報, 15: 63-64.
- 9) 鈴木一郎・安藤 剛・藤田泰仁・北田徳蔵・森地敏樹, 1982. *Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* の共生的ならびに拮抗的關係について. 日畜会報, 53: 161-169.
- 10) Veringa, H. A., T. E. Galesloot and H. Davelaar, 1968. Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk and Dairy J., 22: 114-120.

Summary

It has been reported that acid production of *L. bulgaricus*, which is used as one of yogurt starters, is accelerated when cultivated with *S. thermophilus*. This symbiosis is such that formic acid produced by *S. thermophilus* accelerates the growth and the acid production of *L. bulgaricus*.

This study was carried out in order to clarify the effects of heating milk in the symbiosis explained above.

As a result, the acid production by *L. bulgaricus* 2139 was accelerated by higher temperatures and longer time in heating of skim milk. Formic acid production was increased at 6.3 ppm in the 10% skim milk solution heated at 100°C for 10 minutes, by contrast with 2.7 ppm in the heated milk at 80°C for 10 minutes, and 26 ppm of the acid was detected at 120°C for 5 minutes of sterilization. Higher acidity in the mixed culture of *L. bulgaricus* 2139 and *S. thermophilus* 2137 was obtained as the heating time (10, 20, 30 minutes) to the skim milk was longer. Furthermore, 38.7 ppm of the acid was measured after 12 hours in the milk, at 120°C for 5 minute sterilization, which was inoculated with *S. thermophilus* 2137, compared with 4.5 ppm in the milk heated at 80°C for 10 minutes under the same condition as described above. In addition sodium formate at 20 ppm to the skim milk, acid production by *L. bulgaricus* 2139 increased 2.7-fold, and the viable count showed 10-fold, against the case of non-addition of sodium formate.

Consequently, it was concluded that formic acid produced by *S. thermophilus* 2137 cultivated in milk and by heat processing of milk reacted upon each other and increased the production of the acid.