



## ジャガイモスターターより分離した発酵性細菌 (*Enterobacter cloacae*) の同定

長野宏子, 大森正司\*, 田村朝子\*, 庄司善哉\*\*

(岐阜大学教育学部, \* 大妻女子大学家政学部, \*\* 秋田大学教育学部)

平成6年12月10日受理

### Identification and Characteristics of Leavening Bacteria (*Enterobacter cloacae*) from Potato Starter

Hiroko NAGANO, Masashi OMORI, \* Asako TAMURA \* and Zenya SHOJI \*\*

Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-11

\* Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102

\*\* Faculty of Education, Akita University, Akita 010

**Keywords:** potato starter ジャガイモ発酵, leavening bacteria 発酵性細菌, *Enterobacter cloacae* エンテロバクター.

#### 1. 緒言

饅頭における伝統的な自然発酵法については、発酵源を果実種・野菜種に求めており、この中の微生物を一般に野生酵母と記載しているにすぎない<sup>1)2)</sup>。また、これらの中では自然発酵による方法が少なくなり市販酵母が多く使われている理由<sup>1)</sup>として伝統的な方法は味の良い饅頭を作るとしながらも、失敗が多いことをあげている。東南アジア、中国、バングラディッシュ、ネパール、インド等で収集した小麦粉発酵製品中に、酵母以外の多くの細菌が今でも関与していることを見いだしている。

日本でもパン製造が行われ始めた明治初期には、特別のパンイーストは入手困難であったことから、発酵源としてジャガイモなどをイースト菌として使った記録がある<sup>3)</sup>。また、実際に伝統的な方法により九州地方では戦前・戦後の食糧難時に、ジャガイモを小麦粉と混合して饅頭を作り、子供におやつとして与えていたという。われわれは、今までにリンゴ浸漬水から発酵(スターター)を調製し、発酵膨化に関与している *Enterobacter cloacae* GAO 株<sup>4)</sup>を分離し、安全性<sup>5)</sup>および食品への応用<sup>6)</sup>を検討してきた。

今回は、九州地方に伝わる自然発酵源としてジャガ

イモを用いる方法を検討した。ジャガイモからスターターを調製、その中の微生物を単離して *E. cloacae* の普遍的な存在を明らかにすることと饅頭への応用を検討することを目的とした。

#### 2. 実験材料および実験方法

(1) ジャガイモスターター製造の材料および配合割合

ジャガイモ発酵の材料・配合割合および方法を Table 1, Fig. 1 に示した。ジャガイモは摺り下ろし小麦粉と混合し、耳たぶ程度の硬さまで混捏した。一次発酵は 30℃ で 15~20 時間後、すだちを確認しジャガイモスターターとした。

(2) 微生物の分離とガス発生能について

一次発酵ドウ(ジャガイモスターター)からブイヨン培地により微生物の単離を行った。ガス発生能の確認にはブイヨン寒天培地に 5% グルコースを加えたブイヨン・グルコース培地を用いた。各細菌のガス発生能をダーラム管で、ガス発生量はアインホルン管を用いて測定した。

(3) 分離菌の同定

分離した細菌の同定は、アピ 20 (アスカ純薬(株))

Table 1. Compositions of potato starter and mantou

Materials	Potato starter (g)	Mantou (g)
Hard flour	150	100
Soft flour	150	100
Potato (fresh)	200	—
Sugar	—	10
NaCl	—	1
Distilled water	30	—
Cell suspension	—	105
Total	530	316

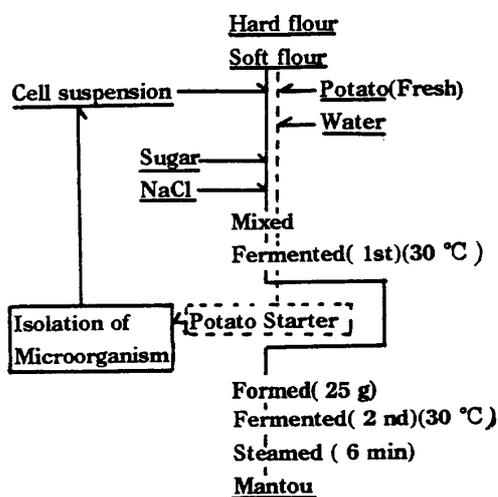


Fig. 1. Manufacturing process of starter and mantou

の簡易同定法<sup>7)</sup>によって行った。さらに Cowan らの方法<sup>8)</sup>および Bergey の細菌分類マニュアル<sup>9)</sup>に準拠してグラム染色、オキシダーゼテスト、硝酸塩の還元、VP テスト等の各種性状検査後、同定を行った。

#### (4) 分離菌の饅頭への応用

饅頭の作り方は前報<sup>6)</sup>にしたがった。すなわち分離した微生物を G 培地<sup>10)</sup>で、37℃、24 時間培養した。培養液を水の代わりに用い、小麦粉（薄力粉、強力粉：日清製粉(株)製、カメリヤ、フラワー）、砂糖、食塩と混合し、30℃で一次発酵、二次発酵を行い、蒸して饅頭を製造した。市販乾燥酵母（日新製粉(株)製、顆粒スーパーカメリヤ）は予備発酵後、小麦粉等の材料と混合し、酵母と細菌の混合のものは水の代わりに培養液を用いた<sup>6)</sup>。饅頭の pH は、饅頭 10 g を蒸留水 100 ml によく懸濁させ、pH メーター（ホリバ製）で測定した。

#### (5) 饅頭の官能検査

分離細菌、酵母および細菌酵母混合を用いて製造した饅頭は訓練されたパネル 17 名で順位法により官能検査を行った。検定は Kramer 法を用いた。

### 3. 結果および考察

#### (1) ガス発生能を持つ細菌の分離とガス発酵能

ジャガイモを搾りおろして小麦粉に混合して一次発酵を行った結果、ドウはすだち、スターターとして十分に用いられるものであった。一次発酵時間は、約 20 時間であった。リンゴ浸漬水<sup>11)</sup>を用いた場合に比べ、3～4 倍の一次発酵時間を要しているが、この事は、ジャガイモおよびリンゴ浸漬水中の成分の差によることが示唆される。

ジャガイモを用いた一次発酵ドウからブイヨン寒天培地を用いて細菌を分離した。これらの中より、ガス発生を行う細菌 5 株を分離することができた。

#### (2) 分離した微生物の同定

ジャガイモ発酵から分離した細菌 5 株について API バイオタイプ<sup>7)</sup>で簡易同定を行った結果、全て *Enterobacter* 属であった。各項目の判定をさらに確認するために、簡易同定した細菌の中からアインホルン管を用いて測定し、ガス発生速の早い PF1、PF5 を選択した。それらを Cowan らの方法<sup>8)</sup>および Bergey の細菌分類マニュアル<sup>9)</sup>に準拠して同定を行った結果を Table 2 に示した。ジャガイモをスターターとしたドウから分離した細菌 (PF1、PF5) は、糖からの酸生成が同じタイプの *E. cloacae* であった。今までにリンゴ浸漬水から分離している *E. cloacae* GAO 株<sup>4)</sup>およびタイプカルチャーである *E. cloacae* IAM 12349 株とはイノシトールからの酸生成においてタイプの異なるものであった。タイの伝統発酵食品カノンターン (Khanomtaan) の果物種であるパームジュース<sup>12)</sup>から分離した *E. cloacae* とはアドニトールからの酸生成が異なるものであった。伝統的な野菜種・果物種から同じ細菌 *E. cloacae* が分離できたことは普遍的に関与しているという事を示し、大変興味をもつところである。

アフリカにおける伝統的穀類発酵食品に関与している微生物についての報告によると、ソルガム粉<sup>13)</sup>から同様の微生物 *E. cloacae* が分離されている。また一方、われわれはタイの揚げパン<sup>12)</sup>のドウから *Klebsiella* 属を分離しているが、同様の菌がキャッサバ粉<sup>14)15)</sup>、ソルガム粉<sup>13)</sup>、テフ粉<sup>16)</sup>から分離されており、また *En-*

ジャガイモスターターより分離した発酵性細菌 (*Enterobacter cloacae*) の同定

Table 2. Characteristics of leavening bacteria from potato starter

Characteristics	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>9)</sup>	Strain				
		GAO <sup>4)</sup>	PF1	PF5	PJ2	PJ4 <sup>11)</sup>
Shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Spore	—	—	—	—	—	—
Gram stain	—	—	—	—	—	—
Motility	+	+	+	+	—	+
Oxidase	—	—	—	—	—	—
Catalase	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
Gas formation (glucose)	+	+	+	+	+	+
Indole formation	—	—	—	—	—	—
Methyl red	—	—	—	—	—	+
VP test	+	+	+	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	—	—	—	—	—	+
Urea decomposition	—	—	—	—	+	+
Deamination of phenylalanine	—	—	—	—	—	+
Decarboxylase of lysine	—	—	—	—	+	—
Decarboxylase of ornithine	+	+	+	+	—	+
Arginine dehydrolase	+	+	+	+	—	—
Liquefaction of gelatine			—	—	—	+
Utilization of malonate	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> reduction	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+
Acid formation from :						
Adonitol	d	—	—	—	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Inositol	—	—	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	—
Dulcitol	[—]	+	+	+	—	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Melibiose			+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+

d : differs among strains ; [—] : 11-25% positive. PF represents fresh potato. No. 1 and No. 5 indicate strain No. of isolated bacteria. PJ, palm juice.<sup>11)</sup>

*terobacteriaceae* はテフ粉<sup>17)</sup>からの分離が報告されている。伝統食品中の発酵性細菌および腸内細菌の普遍的な存在とその役割については、さらに検討が必要である。

## (3) 分離した細菌の饅頭への応用

分離した細菌 *E. cloacae* をそれぞれ G 培地で培養し、その培養液を用いて既報の方法<sup>6)</sup>により饅頭製造を行った。いずれも良好な膨化を示し、各饅頭の pH

は pH 5 前後であり、酸味を感じずほどのものではなかった (Fig. 2)。本研究では、酵母以外のものの発酵力について検討し、その結果、酵母を用いず *E. cloacae* のみで十分にスターターとしての働きを持つことが明らかとなった。

現実のドウには酵母と細菌が共存している。そのため分離した細菌 *E. cloacae* (PF1)、酵母、さらに細菌

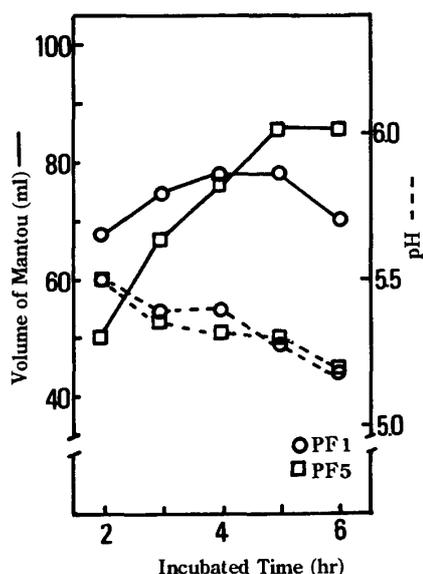


Fig. 2. Changes of mantou's volume and pH during secondary fermentation of dough

PF strain Nos. are same as Table 2.

Table 3. Sensory evaluation of mantou

	Mixture of		
	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i> and dry yeast	Dry yeast
Color	24*	28	50*
Flavor	33	25*	44*
Sponginess	26*	30	46*
Taste	28	28	46*
Total	26*	27	49*

\* Represent significant difference at 1% , respectively.

*E. cloacae* と酵母との混合した饅頭を製造して、その官能検査の結果を Table 3 に示した。細菌 *E. cloacae* を用いたものは蒸した饅頭の表面に艶があり、酵母を用いたものは蒸し調理による表面の陥没が起こりやすいものであったためか、色や艶の点等有意差のあるものであった。蒸し料理にはこのような細菌を用いた方が総合的に好まれるものであった。

以上のように伝統的な発酵食品には、酵母だけでなく細菌も伝統的な発酵食品に関与しているものと思われる。

#### 4. 要 約

伝統的な小麦粉発酵食品の、特に膨化食品を対象にし、関与している微生物を分離することを目的とした。膨化にはガス発生が不可欠であるため、ガス発生能をもつ微生物の検索を行った。

(1) 九州地方に伝わる自然発酵源としてジャガイモを用いた小麦粉発酵ドウから *Enterobacter cloacae* を分離した。

(2) 単離した細菌である *E. cloacae* を用いて饅頭を製造した結果、良好な膨化を示し、十分にスターターとしての働きをもつものであった。

#### 引用文献

- 主婦の友社(編)：中国料理の基礎，主婦の友社，東京，118 (1957)
- 中尾佐助：料理の起源，日本放送協会，東京，49 (1972)
- 高木和夫：食からみた日本史一下，芽ばえ社，東京，223 (1987)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：農化，**61**，357～359 (1987)
- Nagano, H., Kasuya, S., Omori, M., Yano, T. and Shoji, Z.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1301～1302 (1988)
- Nagano, H., Omori, M. and Shoji, Z.: *J. Food Sci.*, **56**, 106～108 (1991)
- Smith, P. B., Tomfohrde, K. M., Rhoden, D. L. and Balows, A.: *Appl. Microbiol.*, **24**, 449～452 (1972)
- Cowan, S. T.: *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, England and Wales, 66 (1974)
- Richard, C.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.1 (ed. by Krieg, N.R. and Holt, J. G.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 465 (1984)
- Kramer, V. C., Calabrese, D. M. and Nickerson, K. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 973～976 (1980)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：家政誌，**38**，865～869 (1987)
- Nagano, H., Omori, M., Shoji, Z., Iibuchi, S. and Arai, M.: *J. Home Econ. Jpn.*, **45**, 219～226 (1994)
- Mohammed, S. I., Steenson, L. S. and Kireleis, A. W.: *Environ. Microbiol.*, **57**, 2529～2533 (1991)
- Okáfor, N., Ijioma, B. and Oyolu, C.: *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 1～13 (1984)
- Adegoke, G. O. and Babalola, A. K.: *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 449～453 (1988)
- Berhanu, A. G., Meaza, G. and Abraham, B.: *An Ethiopian J. Sci.*, **5**, 69～71 (1982)
- Berhanu, A. G.: *J. Food Sci.*, **50**, 800～801 (1985)