

原 報

イエメン産の伝統的自然発酵乳“ラバン”の
菌叢ならびに官能特性の解析荒井威吉¹・中島景典¹・丸山千弘玲¹・中村 正¹・戸羽隆宏²・浦島 匡¹¹帯広畜産大学畜産学部生物資源科学科²弘前大学農学部生物資源科学科Microflora of Microorganisms and Several Characteristics of Laban,
A Traditional Natural Fermented Milk in YEMENIkichi Arai¹, Keisuke Nakajima¹, Chigure Maruyama¹, Tadashi Nakamura¹,
Takahiro Toba² and Tadasu Urashima¹¹Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,
Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan²Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University,
3, Bunkyo-cho, Hirosaki, Aomori 036-8561, Japan)

Summary

Microflora of lactic acid bacteria and yeasts of Laban which had been made with bovine or ovine milk by traditional natural fermentation in Yemen, were studied. The mean of viable cell counts of microorganisms in Laban was 6.4×10^8 cfu/ml. The 60 strains of lactic acid bacteria and 24 strains of yeasts were isolated and identified.

The percentages of strains on lactic acid bacteria flora were as follows: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*① was dominant in 88%. *Lc. lactis* subsp. *lactis*②, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, and *Leuc. lactis* were in 5, 5, and 2%, respectively. It was recognized that the some characteristics of *Lc. lactis* subsp. *lactis*① of the dominant strain were different from those of *Lc. lactis* subsp. *lactis*②.

The percentages of strains on yeast flora were as follows: *Trichosporon sericeum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida kefyr* were dominant in 34, 21, and 21%, respectively. In addition *S. pastorianus*, *C. versatilis*, *C. pseudotropicalis*, and *Zygosaccharomyces microellipsoides* were in 8, 8, 4, and 4%, respectively.

It was recognized that the single culture of *S. cerevisiae* did not produce ethanol in 10% reconstituted skimmilk, but otherwise the mixed culture of the strains together with lactic acid bacteria produced it in 10% reconstituted skimmilk.

The Laban were manufactured by using the several mixed cultures of 4 strains of lactic acid bacteria and 2 strains of yeasts isolated from Laban in Yemen. The each mixed cultures were inoculated in 10% reconstituted skimmilk, and were incubated at 30°C, for 1~5 days. It was found that the rheological scores (G' , G'' and G^*) of the curds increased and the flavor of those were more desirable in the Laban manufactured by the incubation at 30°C, 4 days.

1. 緒 言

世界各地には近代的なスターターの管理技術によって製造されるのではなく、自然発酵によって製造される伝統的発酵乳がある。それらの乳製品においては、空気中からの落下細菌や牧畜環境における環境常在微生物が、原料としての牛乳、水牛乳、馬乳、羊乳、ラクダ乳また

は山羊乳を室温で発酵している。そのような発酵乳はインドネシアにおけるダディヒ¹⁾、ケニアにおけるマジワラ²⁾、エチオピアにおけるエルゴ³⁾、インド、スリランカ、ネパールにおけるダヒ、モンゴルにおけるエードスンスー⁴⁾、アイラグ⁵⁾、カガア、セギー、アンダァ、ベスラグ、エジプトのザバディ⁶⁾などである。

中近東諸国において製造されるラバンも、そのような自然発酵乳の一つである。それは牛乳か山羊乳、羊乳ま

たはラクダ乳を原料として作られ、プレーンタイプまたは砂糖を添加して食される⁷⁾。それはまたケーキ、スープ、ソフトドリンクなどの調製に用いられ、水分を除去してクリームチーズタイプに仕上げられたりする。Baroudi と Collins はレバノンのラバンの発酵には5種の乳酸菌と酵母、すなわち *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc lactis*, *Kluyveromyces fragilis* および *Saccharomyces cerevisiae* が関与していると報告している⁷⁾。またアラブ諸国では、ラブネーと呼ばれるラバンからホエーを排除したセミハードタイプの乳製品が製造されている。Yamani と Abu-Jaber はヨルダンのラブネーにおいて *S. cerevisiae* が優勢菌種である酵母菌叢を報告しており⁸⁾、ラブネーの保存性に関する研究も行われている⁹⁾。

本論文ではイエメン産のラバンにおける乳酸菌および酵母の菌叢とともに、分離された菌株を使用して調製したカードの性質について報告する。また本論文では Baroudi と Collins⁷⁾ によって記述されたレバノン産ラバンとイエメン産ラバンとの乳酸菌および酵母の菌叢の違いを記述する。

2. 材料と方法

2.1. ラバン試料

ラバンは1997年9月にイエメンの首都サナア周辺の村で採集し、採集後直ちに国内に空輸して乳酸菌と酵母の分離に着手した。

2.2. 供試培地

乳酸菌の分離培地には BCP 加プレートカウント寒天培地 (以下 BCP) および標準プレートカウント寒天培地 (以下 SPC) (以上は栄研化学製)、MRS および M17の寒天または液体培地 (以下 MRS, M17) (以上は Merck 社製) を用いた。分離菌株の生理的性質の試験には SYP, 白亜寒天培地および4%NaCl 加 GYP 培地を調製して用いた。また菌株の保存用には BCP を用いた。

酵母の分離培地には、0.1%クロラムフェニコール (和光純薬製) 加ポテトデキストロース寒天培地 (以下 PDA) (栄研化学製) を用いた。

2.3. 乳酸菌、酵母の分離と同定

新鮮なラバンを粉碎し、0.85%生理食塩水で10倍に希釈した。この希釈ラバンをさらに段階希釈した。

乳酸菌の分離では、混釈培養法によりペトリ皿内で段階希釈試料と各種培地を混釈し、MRS および M17は30°Cで72時間、BCP および SPC は30°Cで48時間好気培養した。形成したコロニー数を計測後、平板からコロニー

を鈎菌し、菌株毎に純粋分離を行った。純粋分離した菌株の形態的および生理的性状を調べ、共通の性質を有する菌株毎にグループ化した。炭水化物利用試験は API50CHL (BioMerieux 社製) を用い、供試菌株ごとに調製した接種液を API50CHL プレートに分注して30°Cで48時間培養し、49糖類について発酵性を調べた。菌株の同定は Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 2)¹⁰⁾ に基づいて行った。API50CHL の結果で同定できなかった菌株は、マイクロプレートを用いて基準株との DNA 相同性を調べる DNA-DNA hybridization 法¹¹⁾ により同定した。

また酵母の分離には、ペトリ皿内で段階希釈試料を0.1%クロラムフェニコール加 PDA 培地に混釈し、30°Cで48時間好気培養した。形成したコロニーを鈎菌し、PDA 平板を用いた画線塗抹法により純粋分離を行った。純粋分離した酵母菌株の形態的性状、糖類の発酵性および資化性などの生理的性状を調べ、菌株の同定は Kreger-van Rij の The yeast—a taxonomic study—(third edition)¹²⁾ に基づいて行い、その結果を Kurtzman と Fell の THE YEAST, A TAXONOMIC STUDY (Fourth Edition)¹³⁾ の分類と比較した。

2.4. エタノール発酵性の分析

島津ガスクロマトグラフ GC-14B を用い、1.1 m のガラスカラムに Celite5 (PEG-1500, 23%) を充填し、カラム内温度60°C、キャリアーガス (N₂) 流速30 ml/min の条件で分析した。

ラバンから分離した酵母の単一菌株、または酵母と乳酸菌の混合菌株をスターターとして10%還元脱脂乳に接種し、30°Cに48時間好気条件下で静置培養した。その培養液を水蒸気蒸留し、得られた蒸留液を2回エーテル-n-ヘキサン (2:1) で抽出した。2回分の抽出溶媒を合わせ、内部標準物質として1-ブタノールを添加して¹⁴⁾、ガスクロマトグラフ分析に供した。

2.5. 試作ラバンの調製

10%還元脱脂乳は常圧蒸気殺菌を3回行った。全ての培養は好気条件下で静置培養を行った。ラバンから分離した乳酸菌3菌種4グループ、および酵母3菌種の単一菌株を各々10%還元脱脂乳に接種し、30°Cで48時間培養してシードカルチャーを作製した。各々のシードカルチャーを10%還元脱脂乳に接種して30°Cで48時間培養し、単一菌株スターターを調製した。混合スターターは、各単一菌株スターターを等量ずつ混合して調製した。10%還元脱脂乳に2%量の単一菌株スターターまたは混合スターターを添加し、30°Cで3~5日間培養した。乳酸菌と酵母の混合スターターを培養して試作したものを“試作ラバン”とした。

2.6. 培養カードの粘弾性の測定

レオメータ RAA-FRT (Rheometrics Scientific FE 製, USA) を用いて, 貯蔵弾性率 G' , 損失弾性率 G'' , 複素弾性率 G^* および損失正接 $\tan \delta$ を測定した。

2.7. 官能特性の評価

単一菌株の発酵乳, 混合菌株スターターによる発酵乳または試作ラバンの官能検査は, 本学教員および学生15人のパネラーによって行った。官能検査は外観, 香り, 酸味, 味, 食感および総合評価の6項目について, パネラーが4 (非常に良い), 3 (やや良い), 2 (やや劣る) および1 (非常に劣る) の4段階で評価した。

3. 結果

3.1. 乳酸菌の同定

ラバン中の細菌数は SPC, M17, BCP および MRS の各平板で各々順に 5.6×10^8 cfu/ml, 7.8×10^8 cfu/ml, 5.9×10^8 cfu/ml および 6.1×10^8 cfu/ml であった。

各培地平板からコロニー形態の違いをもとに合計60菌株を分離した。ラバンから分離した60菌株について形態的および生理的性状を調べた結果, 各菌株の生理的性状としてデキストラン生成, リトマスミルク還元性, アンモニア生成およびガス生成の有無に特徴を有していることが認められた。この生理的性状の特徴と形態的性状が共通なもの毎にグループ化した結果, 60菌株は9グループに分類された (表1)。各菌株について API50CHL による炭水化物利用試験を実施し, Ber-

gey's Manual of Systematic Bacteriology (vol. 2)¹⁰⁾ の対照菌種と対比して同定を行った結果, 54菌株が *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2菌株が *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, 1菌株が *Leuc. lactis* と同定されたが, 残りの3菌株は *Lc. lactis* subsp. *lactis* かまたは *Lactobacillus brevis* と推定されたが, 同定には至らなかった (表2)。この3菌株は DNA-DNA hybridization 法¹¹⁾ によって *Lc. lactis* subsp. *lactis* と同定された。しかしこの3菌株は数種類の糖に対する発酵性などが他の54菌株の *Lc. lactis* subsp. *lactis* とは異なっていたので, これらの3菌株を *Lc. lactis* subsp. *lactis*②とし, その他の54菌株を *Lc. lactis* subsp. *lactis*①として区別して分類した。ラバン中の乳酸菌の菌叢は2属3菌種4グループに分類され, 優勢菌株として *Lc. lactis* subsp. *lactis*①が88%を占めており, その他は *Lc. lactis* subsp. *lactis*②が5%, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* が5%および *Leuc. lactis* が2%の構成であった (図1)。

3.2. 酵母の同定

ラバンから分離した酵母は24菌株であった。この酵母24菌株について形態的性状および生理的性質を調べた。形態的性状では, 6菌株が直径3~7 μ mの球形, 10菌株が(4~7)×(6~10) μ mの卵形を示し, 8菌株が(5~8)×(12~17) μ mの円筒形であった。8菌株が1~4個の子嚢胞子を形成した。また14菌株が偽菌糸を形成したが, その中の8菌株は菌糸状を示し, 6菌株は典型的なツリー状の偽菌糸を形成した (表3)。生理的性質として糖類の発酵性と資化性, および硝酸塩の資化性を

Table 1 Taxonomic assay on physiological characteristics for lactic acid bacteria isolated from Laban in Yemen

Group ¹⁾	A	B	C	D	E	F	G	H	I
No. of strains	2	1	10	5	22	8	10	1	1
Cell shape	Cocci								
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Color change of litmus milk	Red	Red	R/B	R/B	Red	Red	Red	Blue	Blue
Reduction of litmus [§]	-	-	+	±	2+	-	+	+	+
Dextran formation [§]	+	+	+	±	-	-	-	2+	-
Ammonia from arginine [§]	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Gas from glucose [§]	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Whey off	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 9.2	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Growth in 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾ The strains were grouped by the agreement following 4 characteristics ([§]): reduction of litmus, dextran formation, ammonia from arginine and gas from glucose

Symbols: + & 2+, Positive; ±, Weak positive; -, Negative; R/B, Red and/or Blue

Table 2 Taxonomic assay on acid production from sugar for lactic acid bacteria isolated from Laban in Yemen

Group ¹⁾	A	B	C-1	D-1	D-2	E	F	G	H	I	C-2
No. of strains	2	1	7	1	4	22	8	10	1	1	3
Acid from:											
N-Acetyl glucosamine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
L-Arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Arbutin	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Cellobiose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Esculin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -Gentiobiose	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Gluconate	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Mannitol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Methadone	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
α -Methyl D-glucoside	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
D-Raffinose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Salicin	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Turanose	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
D-xylose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Identification ²⁾	Lc1	Lc1	Lc1	Lem	Lc1	Lc1	Lc1	Lc1	Lel	Lem	Lc2

Symbols: +, Positive; -, Negative

¹⁾ The strains were regrouped by the same physiological characteristics of acid production from sugars

²⁾ The identified genus: Lc1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*①; Lem, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; Lel, *Leuconostoc lactis*; Lc2, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*② identified by DNA-DNA hybridization method

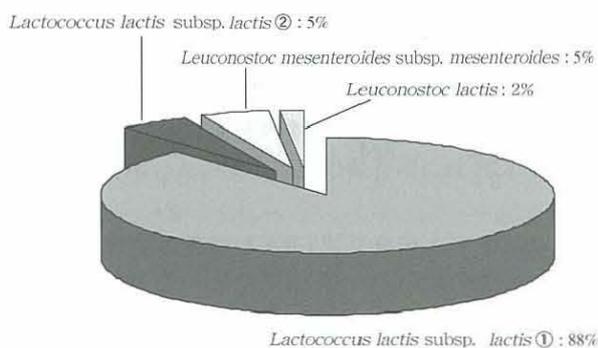


Fig. 1 The microflora of lactic acid bacteria isolated from Laban in Yemen

調べた結果, 全24菌株がアルブチンに対する発酵性と資化性を示さず, また硝酸塩に対する資化性が認められなかった。マルトースの発酵性と資化性は9菌株で認

められ, 6菌株がガラクトースの発酵性と資化性を示した。乳糖に対しては6菌株が資化性を示したが, 発酵性が認められたものは1菌株のみであった。円筒形の8菌株は全供試糖類に対して発酵性を示さなかったが, グルコースとガラクトースには資化性が認められた(表4)。全24菌株について Kreger-van Rijによる The yeast-a taxonomic study-(third edition)¹²⁾に従って対照菌種と対比して同定を行った結果, 円筒形の8菌株は *Trichosporon sericeum* であると同定された。子嚢胞子を形成した8菌株では, 糖類の発酵性および資化性などから, 5菌株はガラクトース発酵性の弱い *Saccharomyces cerevisiae*, 2菌株は *S. pastorianus* と同定され, 1菌株が *Zygosaccharomyces microellipsoides* と同定された。また典型的なツリー状の偽菌糸を形成した卵形の6菌株では, 5菌株がガラクトース発酵性の弱い *Candida kefyr*, 1菌株が *C. pseudotropicalis* と同定された。偽菌糸を形成しなかった球形の2菌株が *C. versati-*

Table 3 Taxonomic assay on morphological characteristics for yeasts isolated from Laban in Yemen

Strain	Cell Shape	Cell Size (μm)	Ascospore		Slide culture	Genus (Family)
			Formation	Number		
1A	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	Candida
8A	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	
1D	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	
2C	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	
4D	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	
4E	Oval	(4~5) × (6~7)	—	—	Pseudomycelium	
2D	Round	3~5	—	—	—	
4B	Round	3~4	—	—	—	
1B	Round	5~7	Round	1~3	—	Saccharomyces
1C	Round	5~7	Round	1~3	—	
2B	Oval	(5~7) × (7~9)	Round	1~3	—	
2E	Round	5~6	Round	1~4	—	
4C	Oval	(4~5) × (7~9)	Round	1~2	—	
3A	Round	5~7	Round	1~4	—	
3D	Oval	(4~5) × (9~10)	Round	1~3	—	
3B	Oval	(4~5) × (7~9)	Round	1~2	—	Zygosaccharomyces
4A	Cylindrical	(6~8) × (15~17)	—	—	Mycerium with septa	Trichosporon
5A	Cylindrical	(5~6) × (12~13)	—	—	Mycerium with septa	
5B	Cylindrical	(5~6) × (12~14)	—	—	Mycerium with septa	
5C	Cylindrical	(5~7) × (16~17)	—	—	Mycerium with septa	
6A	Cylindrical	(5~7) × (16~17)	—	—	Mycerium with septa	
7A	Cylindrical	(5~6) × (12~13)	—	—	Mycerium with septa	
7B	Cylindrical	(5~6) × (12~13)	—	—	Mycerium with septa	
8B	Cylindrical	(5~6) × (14~16)	—	—	Mycerium with septa	

lis と同定された。これらの結果は、Kurtzman と Fell による THE YEASTS, A TAXONOMIC STUDY (Fourth Edition)¹³⁾ の分類に従うと、*C. kefyri* と *C. pseudotropicalis* は *Kluyveromyces marxianus* に分類され、*Tric. sericeum* は *Dipodascus ovetensis* の分類に入る。イエメン産ラバンの酵母菌叢は 4 属 7 菌種に分類され、優勢菌種は *Tric. sericeum* の 34%、*S. cerevisiae* の 21% および *C. kefyri* の 21% であり、この 3 菌種で全体の 75% を占めた。その他は *S. pastorianus* が 8%、*C. versatilis* が 8%、*C. pseudotropicalis* が 4% および *Zygosacch. microellipsoides* が 4% の構成であった (図 2)。

3.3. 酵母の生理的性質およびエタノール発酵性

ラバンで優勢な酵母群である *C. kefyri* (8A) と *Tric. sericeum* (5A)、および *S. pastorianus* (3A) の単一菌株スターターを 10%還元脱脂乳で 30°C で、48 時間培養すると、培養開始時の約 pH 6.6、滴定酸度 0.12% から、8A は 2 日後に pH 5.8、滴定酸度 0.22% となった後ほぼ一定となる推移を示したが、5A および 3A では 5 日間ほとんど変化せず、またこれらの酵母菌株ではカードの形成は認められなかった (図 3)。10%還元脱脂乳で酵母の単一菌株を培養した場合、8A と *C. pseudotropicalis*

の 2 菌種でエタノール発酵性が認められ、そのエタノール濃度は順に 1.1% と 1.3% であった。*S. cerevisiae* は、10%還元脱脂乳における単一菌株の培養ではエタノール発酵が認められなかったが、10%還元脱脂乳に 4% のグルコースを添加すると 1.7% のエタノールを発酵した。また 10%還元脱脂乳で *S. cerevisiae* と *Lc. lactis* subsp. *lactis*① (L1) の混合スターターを 30°C で 48 時間培養した結果、微量のエタノール発酵が認められた。

3.4. 乳酸菌の培養カードの粘弾性と官能特性

L1 と、*Lc. lactis* subsp. *lactis*② (L2)、*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (L3)、および *Leuc. lactis* (L4) の単一菌株スターターを 10%還元脱脂乳で培養した場合、培養開始時の $5 \sim 10 \times 10^6$ cfu/ml から 24 時間で $1 \sim 2 \times 10^8$ cfu/ml に増加し、その後 5 日後まではほぼ一定の推移を示した。pH はスタート時の約 6.6 から漸減し、5 日後には L1、L2、L3 および L4 の順に 4.7、5.6、5.6 および 6.0 となった。滴定酸度は培養開始時の約 0.1% から漸増し、5 日後には L1 は 0.6%、他の 3 菌種は 0.24~0.33% となった。L1 のみが 3 日目にカードを形成し、そのカードの粘弾性は G' : 18.9 Pa, G'' : 6.7 Pa, G^* : 20.0 Pa および $\tan \delta$: 0.35 であった。

Table 4 Taxonomic assay on physiological characteristics for yeasts isolated from Laban in Yemen

Strain No.	Sugar							Potassium nitrate	Identification
	Glucose	Galactose	Maltose	Sucrose	Lactose	Raffinose	Arbutin		
1A	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>C. kefir</i>
8A	+	+	-	+	+	+	-	-	
1D	+	+	-	+	+	+	-	-	
2C	+	+	-	+	+	+	-	-	
4D	+	+	-	+	+	+	-	-	
4E	+	+	-	+	+	+	-	-	<i>C. pseudotropicalis</i>
2D	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>C. versatilis</i>
4B	+	+	+	+	-	+	-	-	
1B	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>S. cerevisiae</i>
1C	+	+	+	+	-	+	-	-	
2B	+	+	+	+	-	+	-	-	
2E	+	+	+	+	-	+	-	-	
4C	+	+	+	+	-	+	-	-	
3A	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>S. pastorianus</i>
3D	+	+	+	+	-	+	-	-	
3B	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Z. microellipsoides</i>
4A	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Tric. sericeum</i>
5A	+	+	-	-	-	-	-	-	
5B	+	+	-	-	-	-	-	-	
5C	+	+	-	-	-	-	-	-	
6A	+	+	-	-	-	-	-	-	
7A	+	+	-	-	-	-	-	-	
7B	+	+	-	-	-	-	-	-	
8B	+	+	-	-	-	-	-	-	

Symbols: +, Positive for fermentation and assimilation; +, Positive for assimilation; -, Negative

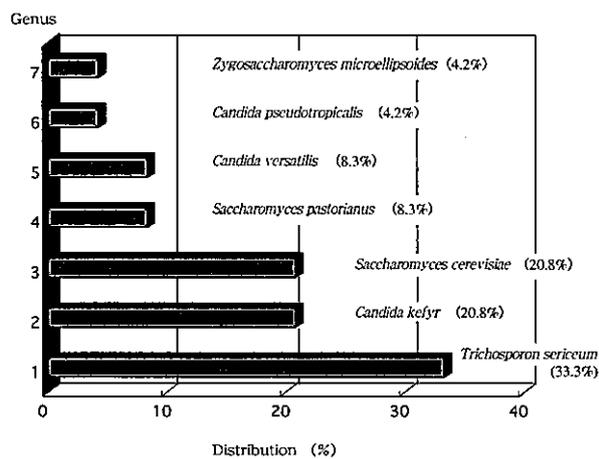


Fig. 2 The microflora of yeasts isolated from Laban in Yemen

ラバンの優勢乳酸菌 L1 をベースに, L2, L3 および L4 を適宜組み合わせた混合スターターを10%還元脱脂乳で培養し, 調製したカードの粘弾性と官能評価の結果は表5に示した。乳酸菌の混合スターターを培養して

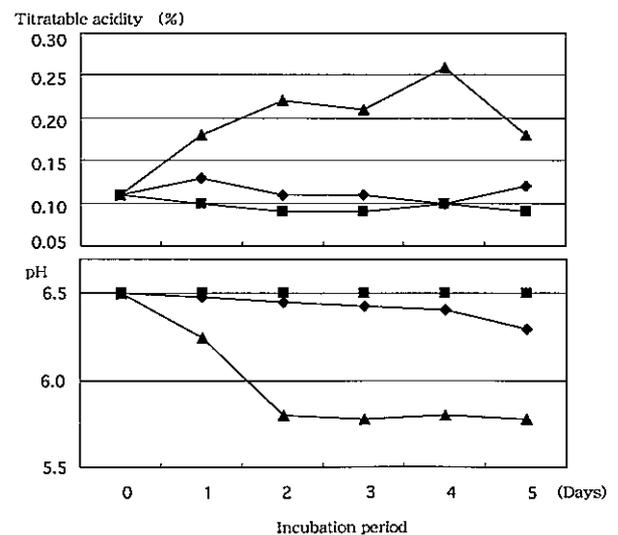


Fig. 3 The changes of titratable acidity and pH in single yeast strain culture which incubated at 30°C, for 1~5 days in 10% reconstituted skim milk
 ▲, *Candida kefir*; ■, *Trichosporon sericeum*; ◆, *Saccharomyces pastorianus*

Table 5 The evaluated rheological and flavor characteristics of the curds by mixed cultures which lactic acid bacteria and/or yeasts were inoculated in 10% reconstituted skim milk, and were incubated at 30°C, for 3~5 days

Curd No.	Lactic acid bacteria ¹⁾				Yeast ²⁾		Days ³⁾	Rheology				Flavor test ⁴⁾			Total evaluation
	L1	L2	L3	L4	5A	8A		G'	G''	G*	Tan δ	Oder	Acidity	Taste	
LM1	+	+	-	-	-	-	3	11.2	4.2	12.0	0.37	2.8	2.2	2.2	2.6
							4	7.8	3.9	9.1	0.36	2.0	2.4	1.9	2.3
							5	18.9	6.9	20.1	0.36	2.8	3.2	3.2	2.5
LM2	+	-	+	-	-	-	3	4.2	1.5	4.6	0.48	3.2	1.8	2.4	2.6
							4	8.4	3.1	9.0	0.35	2.6	1.8	2.3	2.5
							5	15.2	5.7	16.2	0.38	3.2	2.3	2.8	3.0
LM3	+	-	-	+	-	-	3	8.6	3.2	9.2	0.37	3.2	1.8	2.4	2.7
							4	11.7	4.4	12.5	0.38	2.6	2.2	2.4	2.8
							5	16.9	7.1	18.4	0.44	3.2	2.7	3.1	3.1
LMA	+	+	+	+	-	-	3	11.6	4.2	12.4	0.36	2.7	2.3	2.4	2.4
							4	13.9	4.8	14.7	0.35	2.3	2.4	2.4	2.4
							5	10.1	3.9	10.8	0.40	2.7	2.9	2.4	2.6
LYM1	+	-	+	+	+	-	3	5.3	1.9	5.7	0.37	2.7	2.2	2.6	2.5
							4	22.9	7.2	24.0	0.32	2.9	2.5	2.8	2.7
							5	165.4	56.4	175.0	0.34	2.8	2.4	2.7	2.8
LYM2	+	+	-	+	+	-	3	22.4	7.1	23.5	0.32	2.7	2.3	2.7	2.6
							4	57.6	21.7	61.5	0.38	3.0	2.9	2.8	3.0
							5	374.7	120.7	393.6	0.32	2.7	2.2	2.6	2.6
LYM3	+	+	+	+	-	+	3	11.7	3.6	12.2	0.29	2.8	2.4	2.4	2.6
							4	42.8	13.8	45.0	0.32	2.9	2.8	2.6	2.8
							5	182.6	58.6	191.8	0.32	2.6	2.4	2.5	2.6
LYM4	+	+	+	+	+	-	3	20.0	7.0	21.2	0.35	2.7	2.3	2.6	2.4
							4	29.9	9.4	31.4	0.32	2.6	2.6	2.5	2.6
							5	197.5	64.8	207.6	0.33	2.5	2.3	2.3	2.6

Symbols: +, Used strains in mixed culture; -, Not used

¹⁾ L1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*①; L2, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*②; L3, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; L4, *Leuconostoc lactis*. ²⁾ 5A, *Trichosporon sericeum*; 8A, *Candida kefyr*. ³⁾ Incubation periods at 30°C in reconstituted skim milk. ⁴⁾ Tasting value used here: Point 4, Excellent; Point 3, Desirable; Point 2, Disagreeable; and Point 1, Lowest

調製したカードでは、全ての組み合わせで培養3日後にカードが形成された。L1, L2 を含む混合スターターのカードの粘弾性は3日後 G': 9.9~12.8 Pa, G'': 4.1~5.1 Pa, G*: 11.3~13.8 Pa と高く、L3 を含む混合スターターのカードの粘弾性は低くなる傾向が認められた。また培養4日後から5日後にかけて、G', G'', G*ともに増加を示した。しかし、tan δは全てのカードで0.36~0.44となり、粘弾性の比率はあまり変化しないことが認められた。

官能評価のスコアは、全体的に乳酸菌の混合スターターで調製したカードの方が、単一菌株スターターによるカードより高くなる傾向が認められた。香り、味および総合評価の項目は、L1, L4 を含む混合スターターを培養したカードの評価が最も高く、次いでL3 を含むスターターの場合となり、L1, L2 のみでは評価が低くなる傾向にあった。カードの滴定酸度は主としてL1 に依存しているが、酸味の評価はL1, L2 を含む混合スター

ターによるカードの評価が高く、L3 を含むものが低くなる傾向を示した。

3.5. 試作ラバンの粘弾性と官能特性

試作ラバンは、優勢乳酸菌のL1をベースとし、L2, L3, L4, および酵母5A, 8Aの6菌種を用いて試作した。各試作ラバンの乳酸菌数は、培養開始時の1.1~2.6 × 10⁷ cfu/ml から培養1日後には5.2~9.2 × 10⁸ cfu/ml に増加し、その後は一定となった。酵母数は培養開始時の5.1~8.6 × 10⁴ cfu/ml から8Aは1日後に、5Aは2日後に1~3.6 × 10⁶ cfu/ml に増加し、その後一定となる推移を示した。pHは培養開始時の6.6から漸減し、5日間の培養で8Aを除く5菌種を混合したLYM4がpH4.42で最も低くなった。滴定酸度は培養開始時の0.11%から漸増し、5日後には0.55%程度になり、試作ラバンの酸度の上昇にはL1と酵母が関与していることが示された(図4)。

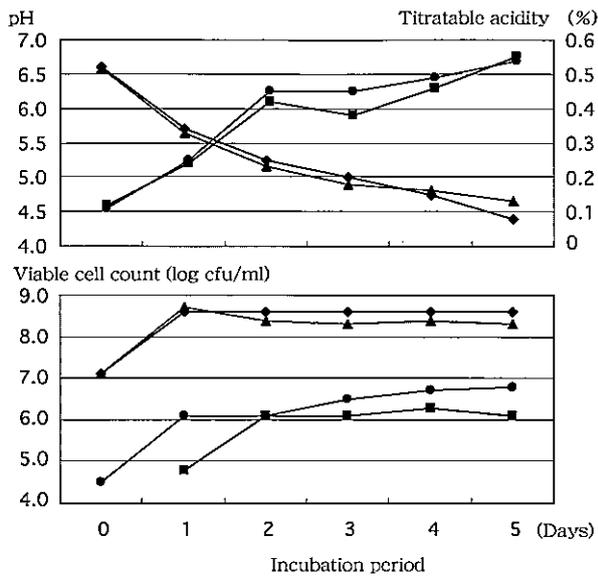


Fig. 4 The changes of pH, titratable acidity, and viable cell counts of lactic acid bacteria and yeasts in 10% reconstituted skim milk incubated at 30°C, for 1~5 days

Symbols: LYM3 (—▲—, pH; —●—, titratable acidity; —▲—, viable cell count of 4 strains of lactic acid bacteria; —●—, *C. kefir*); LYM4 (—◆—, pH; —■—, titratable acidity; —◆—, viable cell count of 4 strains of lactic acid bacteria; —■—, *Tric. sericeum*)

試作ラバンは、全ての組み合わせで培養3日後にカードを形成した。3日後のカードで最も高い粘弾性はLYM2の G' : 22.4 Pa, G'' : 7.1 Pa, G^* : 23.5 Pa, $\tan \delta$: 0.32であり、LYM1は低かった(表5)。各カードの粘弾性は培養3日後と4日後では大きな変化はなかったが、培養5日後のカードでは G' : 165~374 Pa, G'' : 56~120 Pa, G^* : 175~393 Paとなり、カードの粘弾性は著しく上昇する傾向を示した。しかし $\tan \delta$ は0.32~0.34でほぼ類似の水準で推移しており、粘弾性の比率はほとんど変化しないことが認められた(図5)。

試作ラバンの官能評価の結果では、香り、酸味、味および総合評価は4日後に高いスコアが得られ、5日後には低くなる傾向が認められた(表5)。試作ラバンにおける酵母は、エタノール発酵を行う8Aが含まれると香りの評価は高まり、味と総合評価は5Aを含むものの方が高くなった。酸味と味の評価が高いものは総合評価が高くなる傾向があり、またL3を含まない混合スターターの試作ラバンの評価が相対的に高くなる傾向が認められた。味と食感の評価はカードの粘弾性との関係が大きいと考えられた。

相対的に評価が高かった試作ラバンの培養4日後における外観、香り、食感、酸味、味および総合評価に対する官能評価のスコアは図6に示した。最も高いスコア

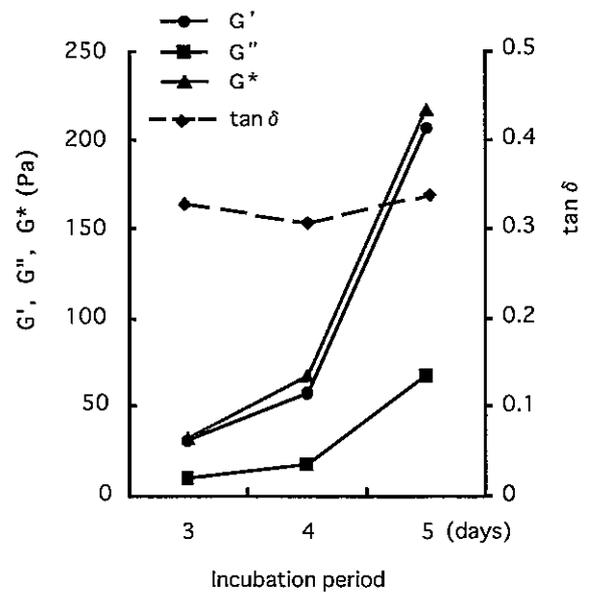


Fig. 5 The changes of rheological characteristics on the Laban for trial manufacture in 10% reconstituted skim milk which was inoculated the mixed culture of LYM6 (*Lc. lactis* subsp. *lactis*①, *Lc. lactis* subsp. *lactis*②, *Leuc. lactis* and *C. kefir*), and incubated at 30°C, for 3~5 days

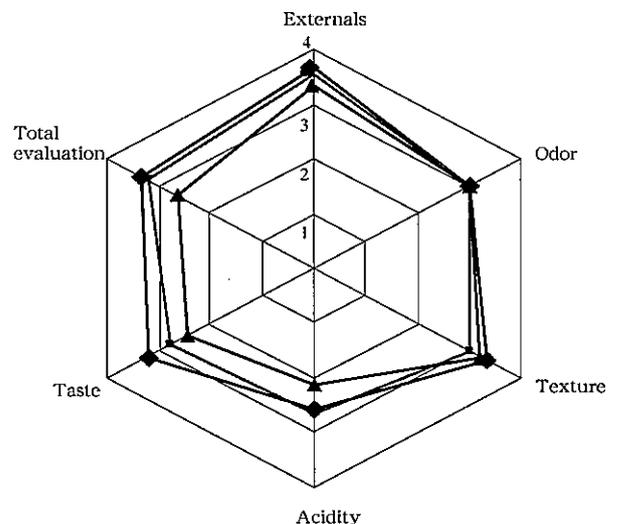


Fig. 6 The highest tasting values on the Laban for trial manufacture incubated at 30°C, for 4 days in 10% reconstituted skim milk which was inoculated into all sort of mixed cultures (4 strains of lactic acid bacteria and 2 strains of yeasts were used) —◆—, LYMA: mixed culture of *Lc. lactis* subsp. *lactis*① (L1), *Lc. lactis* subsp. *lactis*② (L2), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (L3), *Leuc. lactis* (L4), *C. kefir* (8A) and *Trichosporon sericeum* (5A); —■—, LYM2: mixed culture of L1, L2, L4 and 5A; —▲—, LYM5: mixed culture of L1, L2, L4, 5A and 8A

アは乳酸菌4菌種と酵母2菌種の混合スターターを培養したもので、次がLYM2であった。

4. 考察

本研究によりイエメン産ラバンの乳酸菌として、*Lc. lactis* subsp. *lactis*①、*Lc. lactis* subsp. *lactis*②、*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* および *Leuc. lactis* の2属3菌種4グループが同定され、また酵母は *Tric. sericeum*, *S. cerevisiae*, *C. kefyr*, *S. pastorianus*, *C. versatilis*, *C. pseudotropicalis* および *Zygosacch. microellipsoides* の4属7菌種が同定された。一方、レバノン産ラバンでは乳酸菌が *Str. thermophilus*, *Lb. acidophilus* および *Leuc. lactis* の3菌種、酵母は *Kluyv. fragilis* および *S. cerevisiae* の2菌種が報告されている⁷⁾。これらの結果から、イエメン産とレバノン産のラバンの乳酸菌菌叢には類似性が全く認められず、酵母菌叢の類似性も少ないことから、同じ中近東地域で生産されるラバンの中で微生物菌叢の違いが大きいことが認められた。また乳酸菌の種類により乳酸生成能は明らかに異なるので、各々のラバンには発酵性状とカードの粘弾性や酸味などの特性に大きな違いがあるものと推察された。その他の伝統的な自然発酵乳の微生物菌叢では、旧ソビエトのコカサス地方原産のケフィールの乳酸菌は *Lc. brevis*, *Lb. kefir*, *Lb. acidophilus*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Str. thermophilus* が広く見いだされ、酵母は *S. delbrueckii*, *S. cerevisiae*, *Torulopsis kefyr*, *Tor. holmii*, *C. pseudotropicalis* など構成されている。また一方中央アジアの草原地帯の原産で、本来は馬乳から製造されるクーマスの乳酸菌は *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* などで、酵母は *Kluyv. lactis* などのラクトース発酵酵母が知られている¹⁵⁾。これらと比較すると、イエメン産ラバンの菌叢はクーマスよりケフィールに類似点が多く認められる。またエチオピアの伝統的発酵乳エルゴからは主要な乳酸菌として *Lc. lactis* subsp. *lactis* が分離されており³⁾、乳中で *C. kefyr* と同様にエタノール発酵を行う *C. pseudotropicalis* は、日本の原料乳中からも *S. lactis*, *Tor. versatilis*, *Tor. spherica* などとともに分離されている¹⁶⁾。

レバノン産のラバンには1.25%のエタノールが含まれており、*S. cerevisiae* が存在しない場合はエタノールを発酵しないが、アセトアルデヒドの大部分は *Kluyv. fragilis* によって生成されていること⁷⁾から、酵母が風味形成に関与していると推定される。本研究においてイエメン産ラバンの *S. cerevisiae* は、乳中で単一菌株のみではエタノール発酵を行わなかったが、乳酸菌との混合培養によりエタノール発酵が確認された。*Saccharomyces* 属はグルコースとガラクトースの共存下で

はガラクトースを選択的に資化する¹⁵⁾ので、乳中の *S. cerevisiae* は乳酸菌の生成したガラクトースを主に利用し、風味形成に一定の役割を果たしていると考えられた。同様に *Tric. sericeum*, *S. pastorianus* にはラクトース資化性がなく、単一菌株のみでは乳中で酸生成が認められなかったが、乳酸菌との共生によって酸生成、タンパク質分解などが進み、ラバンの味の形成に関与していると考えられた。またモンゴルにおけるエードスンスーでも *S. cerevisiae* が酵母菌叢の80%を占めており⁴⁾、乳酸菌との共生関係が推測される。

Lc. lactis subsp. *lactis*①をベースとする試作ラバンの官能評価は、*Leuc. lactis* を含むものが最も高かった。*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* が含まれるとカードの粘弾性が低くなり、官能評価が下がる傾向が認められた。また試作ラバンにエタノール発酵性のある *C. kefyr* が含まれると、香り、酸味などの評価が高くなったが、味の評価は *Tric. sericeum* が含まれる方が高かった。試作ラバンの酵母には風味を良くし、酸生成量を増加させ、粘弾性の高いカードをつくる効果が認められた。市販されている1つのナチュラルヨーグルトの粘弾性は G' : 129.7 Pa, G'' : 40.2 Pa, G^* : 135.8 Pa, $\tan \delta$: 0.31であった。試作ラバンの官能評価は培養4日後に最も高かったが、培養5日後のカードの粘弾性はこの市販ナチュラルヨーグルトを目安とする水準を大幅に越えており、カードの粘弾性が一定レベルを越えると官能評価が低くなることが示唆された。試作ラバンでは、酵母を含む混合スターターの場合カードの粘弾性は高くなったが、同時に混合される乳酸菌の菌種数が多くなるほどカードは軟らかくなり、官能評価は良くなる傾向が認められた。したがってラバンに含まれる酵母は、乳酸菌との共生によってカードの粘弾性および風味の形成、乳タンパク質の分解などに関与していることが推測された。

ラバンを布袋に入れて吊し、ホエーを排除して作られるセミハードタイプのラブネー (Labaneh) では *S. cerevisiae* が非常に多く、*Tric. brassicae*, *Cryptococcus curvatus*, *Kluyv. marxianus* が優勢な酵母であるが、その他に *Geotrichum*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* 属などが含まれており、ラブネーの shelf-life を短くする欠陥の原因になることが指摘されている⁸⁾。伝統的自然発酵乳においても、乳糖資化性のない *S. cerevisiae* などは古くから受け継がれてきた汚染菌叢の可能性が考えられる。

5. 要約

イエメンでウシまたはヒツジの乳で製造される伝統的自然発酵乳ラバン (Laban) の乳酸菌および酵母の菌叢を調べた。ラバンの生菌数は平均 6.4×10^8 cfu/ml であった。分離した乳酸菌は60菌株、酵母は24菌株であっ

た。

ラバン中の乳酸菌菌叢は2属3菌種4グループに分類され、優勢菌株として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ①が88%を占め、その他は *Lc. lactis* subsp. *lactis* ②が5%、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* が5% および *Leuc. lactis* が2%の構成であった。*Lc. lactis* subsp. *lactis* ②は、優勢な菌株の *Lc. lactis* subsp. *lactis* ①と数種類の糖の発酵性および資化性が異なっていたので区分して分類した。

また酵母菌叢は4属7菌種に分類され、主要な菌種は *Trichosporon sericeum* の34%、*Saccharomyces cerevisiae* の21%および *Candida kefyr* の21%であり、その他は *S. pastorianus* が8%、*C. versatilis* が8%、*C. pseudotropicalis* が4% および *Zygosaccharomyces microellipsoides* が4%の構成であった。

ラバン中に含まれる *S. cerevisiae* は、乳中で単一菌株のみではエタノール発酵を行わなかったが、乳酸菌との共生によってエタノールを発酵したので、ラバンの風味形成に関与していることが推定された。

ラバンから分離した乳酸菌4菌種と酵母2菌種を用いて、10%還元脱脂乳で30°C、5日間の混合培養を行い、ラバンを試作した。培養4日後にカードの粘弾性(G', G''およびG*)は増加し、良好な風味を形成することが認められた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、試料採取に協力いただいた在イエメン日本国大使館の元大使秋山 進氏、元参事官石田正孝氏、岸田派遣員、現地人スタッフのAbdulRehman Thabet AlFaquh氏、YATAトラベル社ガイドのRassam Abdulazack氏、Hashed Hamoud Hamza氏に感謝します。またラバンの菌叢解析において貴重なご助言をいただいた東北大学名誉教授足立 達先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Y. Zakaria, H. Ariga, T. Urashima and T. Toba: *Milchwissenschaft*, **53**, 30-33 (1998).
- 2) T. Nakamura, M. Sugai, A. Nakamura Ozawa, H. Ariga, H. Koaze, C. Kiyukia, I. Arai and T. Urashima: *Milk Science*, **48**, 9-13 (1999).
- 3) 米屋武文・中島 肇・清水希和・宮本 拓・片岡啓: *ミルクサイエンス*, **48**, 65-71 (1999).
- 4) 那日松・北本 豊: *日畜会報*, **66**, 555-563 (1995).
- 5) 石井智美: *ミルクサイエンス*, **50**, 25-30 (2001).
- 6) S. A. Abou-Donia: *New Zeal. J. Dairy Sci. & Tech.*, **19**, 7-18 (1984).
- 7) A. A. G. Baroudi and E. B. Collins: *J. Dairy Sci.*, **59**, 200-202 (1976).
- 8) M. I. Yamani and M. M. Abu-Jaber: *J. Dairy Sci.*, **77**, 3558-3564 (1994).
- 9) J. F. Mihyar, M. I. Yamani and A. K. Al-Sa'ed: *J. Dairy Sci.*, **80**, 2304-2309 (1997).
- 10) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore (1986).
- 11) T. Ezaki, Y. Hashimoto and E. Yabuuchi: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 224-229 (1994).
- 12) N. J. W. Kreger-van Rij: *The yeast—a taxonomic study—third edition*, Elsevier Science Publishers B. V.-Amsterdam (1984).
- 13) C. P. Kurtzman and J. W. Fell: *THE YEASTS, A TAXONOMIC STUDY* (Fourth Edition), Elsevier, Amsterdam-Tokyo (1998).
- 14) 中西武雄・荒井威吉: *酪農科学の研究*, **19**, A-169-A-175 (1970).
- 15) 足立 達・伊藤敏敏: *乳とその加工*. 278-301. 建帛社. 東京 (1987).
- 16) 中西武雄・荒井威吉: *酪農科学の研究*, **18**, A-20-A-25 (1969).