

氏 名(本籍) かね 子 勉

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 336 号

学位授与年月日 昭 和 62 年 12 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 乳酸菌の生残性と香気成分生産性の改善  
に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 足立 達 教授 伊崎 和夫

助教授 伊藤 敏敏

# 論文内容要旨

## 序論

乳酸菌スターターにおいて、液状濃縮菌の保存性改善に関する研究例は、凍結菌および凍結乾燥菌に比較すると極めて少ない。しかし、本スターターは、調製法ならびに使用法がいずれも簡便である。従って、冷蔵保存しても、生残性、生酸活性ならびに香気成分生産性の優れた濃縮菌スターターの製造法が確立されれば、発酵乳製品工業において極めて有用なものとなる。

一方、本スターターを含めた乳酸菌の香気成分生産性は、発酵条件により著しく影響を受ける。従って、発酵乳中の主要な香気成分である、アセトアルデヒド、ジアセチル、エタノール等の生成を容易に制御することが可能となれば、発酵乳製品品質の安定化に大いに資することになる。

本論文では、乳酸菌の生残性に及ぼす要因の解析とその改善法を検討した。更に、乳酸菌が産生する香気成分の生成促進に関与する要因と、その作用機構を中心に検討した。

## 1. 乳酸菌の生残性・生酸活性ならびに香気成分生産性の特性把握

乳酸桿菌 (*Lactobacillus bulgaricus* 1067, *Lactobacillus helveticus* 1408, *Bifidobacterium longum* 6001) は、乳酸球菌 (*Streptococcus thermophilus* 3002, *Streptococcus lactis* subsp.

Table 1 Resistance of Lactic Acid Bacteria to  $H_2O_2$ .

Strain	Viable counts (cfu/ml)		Survivors (%)
	Before exposure	After exposure	
<i>L. bulgaricus</i> 1067	$5.1 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$	100
<i>L. helveticus</i> 1408	$7.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^3$	0.02
<i>S. thermophilus</i> 3002	$1.8 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	78
<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 3022	$2.5 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	100
<i>L. cremoris</i> 5004	$6.2 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$	87
<i>B. longum</i> 6001	$1.2 \times 10^8$	$2.8 \times 10^7$	23

The resistance of the lactic acid bacteria to  $H_2O_2$  was determined as described under "Materials and Methods". After the cells were exposed to  $H_2O_2$  (200 mg/L) at 30°C for 60 min, survivors (%) were determined.

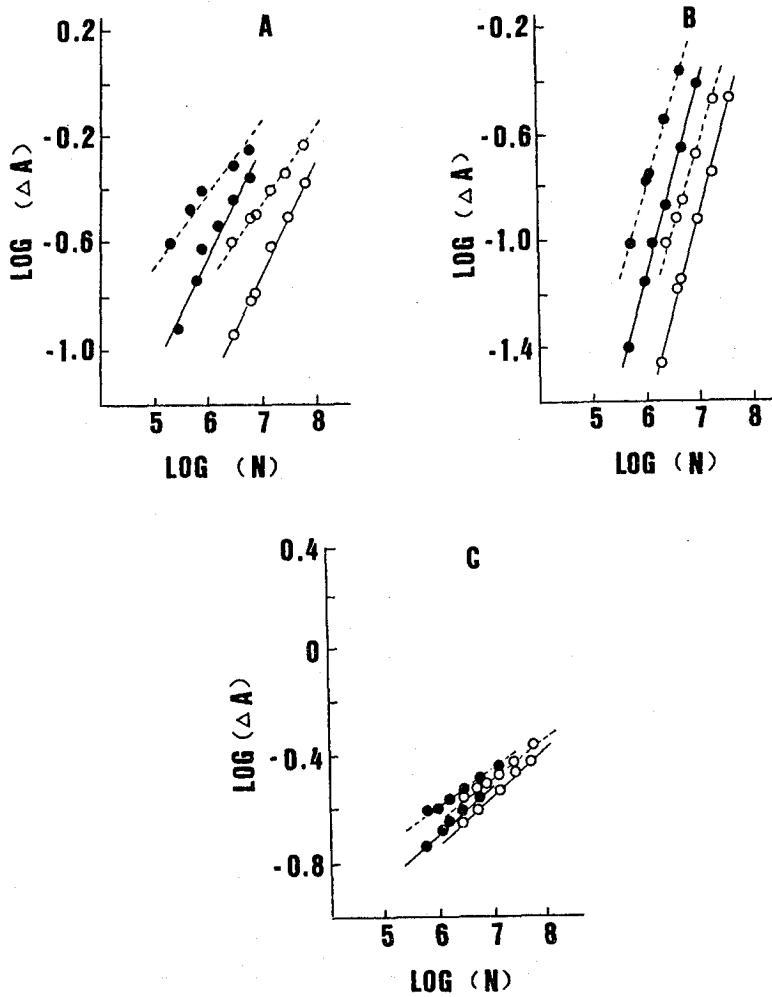
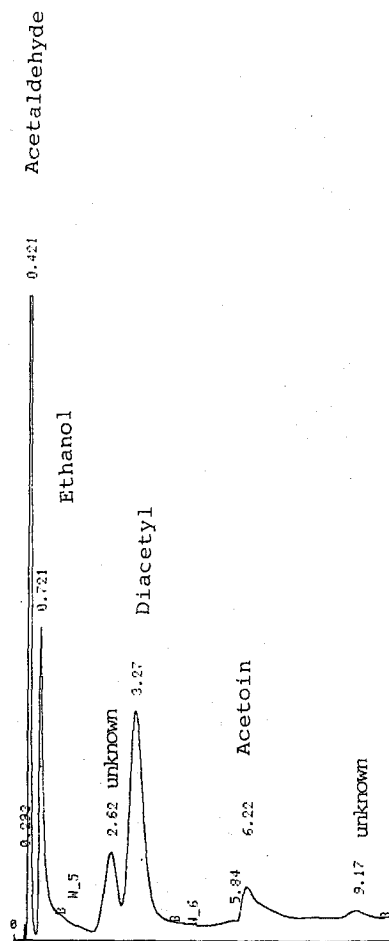


Fig. 1 Relationship between Acid Production ( $\Delta A$ ) and Viable Counts ( $N$ ) just after Inoculation of the Liquid Concentrated Culture into 10 % Reconstituted Skim Milk Medium.  
 A, *L. bulgaricus* 1067; B, *L. helveticus* 1408; C, *S. thermophilus* 3002, Fresh liquid concentrated culture (●), liquid concentrated culture stored at 5 °C for 16 days, aerobically (○). Four hours incubation (solid lines), five hours incubation (broken lines).



**Fig. 2** Gaschromatogram of Acetaldehyde, Ethanol, Diacetyl and Acetoin. Analysis was performed by the head space gas chromatographic technique on a Perkin-Elmer Dual FID Chromatograph SIGMA 300 with 1.8 m  $\times$  3 mm OD. steel column packed with Unicarbon A - 200, 60 ~ 80 mesh. One gram of the sample was transferred into a vial and then the vial was closed by a rubber septum and an aluminium cap. Sample was heated at 80 °C for 30 min, followed by injection. After holding the column temperature at 70 °C for 4 min, the temperature rise was programmed at a rate of 30 °C per min from 70 to 130 °C. The nitrogen-flow rate was 30 ml per min and the temperatures of injection port and detector were 150 °C.

*diacetylactis* 3022, *Leuconostoc cremoris* 5004) に比較すると、生残性が劣った。1408株と6001株はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性が低い(表1)ので、これら供試菌の生残性には自ら産生したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が影響することを示唆した。

一方、供試乳酸菌を脱脂粉乳培地に接種した際の生菌数(N)と、一定時間培養後の生酸量(△A)のそれぞれの対数値には、直線関係が成立した(図1)。この結果をもとに、1067株、1408株、3002株の生酸活性(B)は、 $B = \Delta A / N^{0.42}$ ,  $B = \Delta A / N^{0.74}$ ,  $B = \Delta A / N^{0.18}$ で示す、それぞれの回帰式より算出されることを認めた。香気成分生産性についても同様の方法で表現することが可能であった。本法により、冷蔵保存した乳酸菌の生酸活性と香気成分生産性を測定すると、いずれも低下することを認めた。なお、各種香気成分生成量は、ヘッドスペースガスクロマトグラフィーにより、一括して測定することが可能であった(図2)。

## 2. *Bifidobacterium longum* の生残性改善

6001株は、NADHオキシダーゼによりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成した。本菌のpH4.7培養菌は、pH6.0培養菌よりNADHオキシダーゼ活性が高く、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量も高かった(表2)。これに対し、

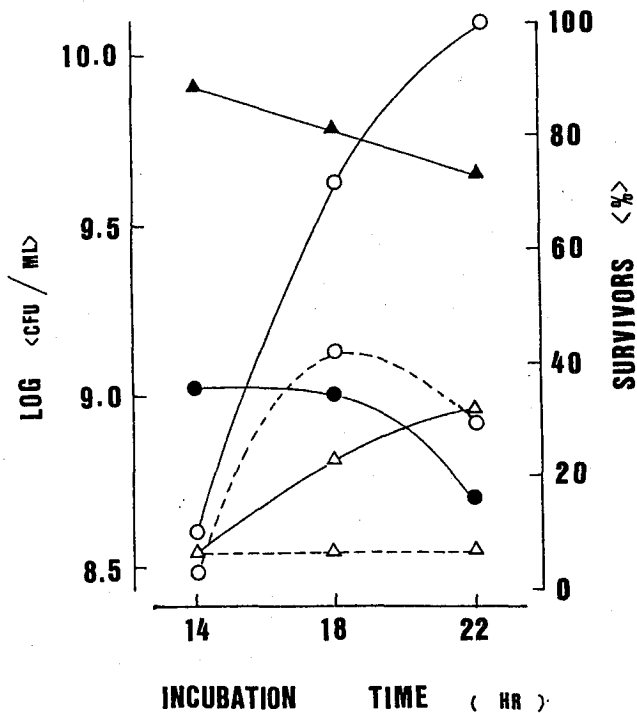
**Table 2** Effect of Culture pH on NADH Oxidase Activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production by *Bifidobacterium longum* 6001.

Culture pH	NADH oxidase activity (mU/mg protein)	Viable counts before storage (cfu/ml)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) found	
			Before storage	After storage <sup>a)</sup>
4.7	101	$4.9 \times 10^9$	3.6	10.1
6.0	30	$1.4 \times 10^{10}$	0.4	0.5

a) *B. longum* 6001 cells were stored at 15°C for 5 days.

pH4.7培養菌は、pH6.0培養菌より生残性が高かった。すなわち、本菌の生残性と、NADHオキシダーゼ活性もしくはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量とは、明らかな因果関係が存在しなかった。

そこで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性を調べると、pH4.7培養菌は、pH6.0培養菌よりH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性が高いことが分かった(図3)。また、培地の炭素源を変えて培養した6001株のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性と、生



**Fig. 3** Resistance of *Bifidobacterium longum* 6001 Cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
*B. longum* 6001 cells were incubated at pH 4.7 and at pH 6.0, respectively, by addition of 2 N NaOH as a neutralizer. Viable counts (pH 4.7, —●—; pH 6.0, —▲—) were determined and resistance of the cells to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was estimated by determining survivors (%) after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells grown at pH 4.7 were exposed to 100 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—○—), 200 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (--○--) and cells grown at pH 6.0 were exposed to 100 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (—△—) and 200 mg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (--△--) at 30°C for 60 min, respectively.

残性の挙動はほぼ一致した。すなわち、本菌の生残性にはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性が大きく影響することが結論できた。このことは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性変異株が、親株より生残性が高くなることから支持できた(図4)。一方、カタラーゼ、もしくは酵母の生細胞又はその無細胞抽出液を保存液に加えると、いずれも同程度の6001株に対する生残性改善効果を認めた。すなわち、酵母の共存による6001株の生残性改善には、酵母の有するカタラーゼに類する物質が作用していることを明らかにした。

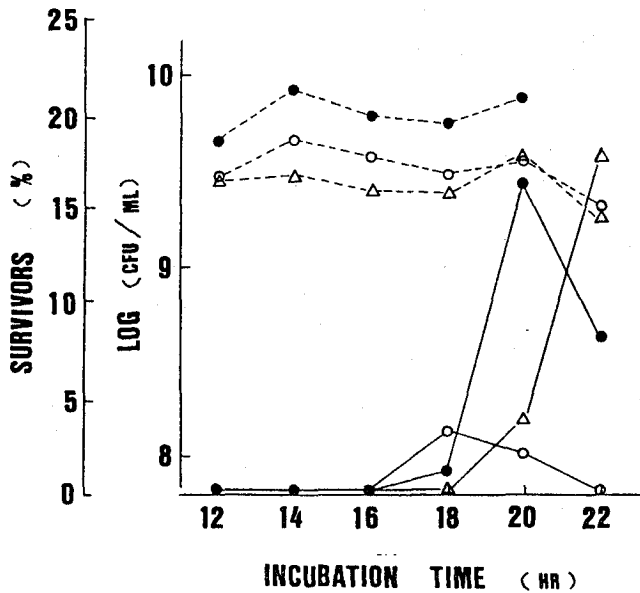


Fig. 4 Viabilities of *Bifidobacterium longum* 6001 and Its  $H_2O_2$ -Resistant Mutants (No. 1022, No. 3041). *B. longum* 6001 and its mutants cells were incubated in TPYG medium at  $37^\circ C$  at pH 4.7. The washed cells with sterilized distilled water were suspended in 0.1 M lactate buffer (pH 5.0) and stored at  $10^\circ C$  for 7 days. Viable counts during incubation (broken lines) and survivors (%) after storage (solid lines) were determined. *B. longum* 6001 (○), No. 1022 (●) and No. 3041 (△).

### 3. *Lactobacillus bulgaricus* の生残性、生酸活性ならびにアセトアルデヒド生産性の改善

Span 80 添加培地で1067株を培養して得た濃縮菌に、アスコルビン酸ナトリウムを添加し、更に窒素ガスを通気して保存すると、 $5^\circ C$ で14日間保存後でも、生菌数および生酸活性が殆ど低下しなかった(表3)。アスコルビン酸ナトリウムの添加は、保存液のEhを低めると共に、本菌が産生した $H_2O_2$ と反応することから、活性酸素による毒性発現を抑制するものと推察した。一方、1067株を Span 80 株添加培地で培養すると、菌体膜脂質のオレイン酸含有量が増加し(表4)、示差走査熱量測定による菌体膜脂質の吸熱ピークが低温側に移動することを認めた(図5)。

**Table 3** Changes in Acid-Producing Activity and Viability of the Liquid Concentrated (LC) Culture of *Lactobacillus bulgaricus* 1067 During Storage.

Addition to growth medium	Addition to LC culture	Measurement	Storage time (days)			pH <sup>e)</sup>	Eh <sup>e)</sup> (mV)
			at 5 °C				
			start	8	14		
none	none	A <sup>c)</sup>	100	73	15	4.35	435
		B ( $\times 10^{-5}$ ) <sup>d)</sup>		16	3		
	0.1 %As-Na <sup>a)</sup>	A	100	64	25	4.25	379
		B ( $\times 10^{-5}$ )		28	26		
	0.1 %As-Na + N <sub>2</sub> <sup>b)</sup>	A	100	86	53	4.21	234
		B ( $\times 10^{-5}$ )		27	25		
0.1 % Span 80	none	A	100	73	55	4.35	394
		B ( $\times 10^{-5}$ )		25	15		
	0.1 %As-Na	A	100	68	55	4.30	381
		B ( $\times 10^{-5}$ )		32	25		
	0.1 %As-Na + N <sub>2</sub>	A	100	100	100	4.38	201
		B ( $\times 10^{-5}$ )		30	25		

a) Sodium ascorbate.; b) N<sub>2</sub> gas was bubbled into the culture for 3 min before storage.; c) Survivors (%), The viable count before storage was  $4.5 \times 10^9$  cfu/ml.; d) Acid-producing activity (B), The B value of the fresh culture subcultured twice before use was  $29 \times 10^{-5}$ .; e) After the cultures were stored for 14 days, the pH and Eh were determined, respectively.

**Table 4** Fatty Acid Composition of the Lipids of *Lactobacillus bulgaricus* 1067.

Addition to growth medium	Lipid fraction	Fatty acids (relative percentage)							
		C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18:1</sub>	Other
none	Free	1.5	2.2	9.1	57.7	0.9	6.0	17.4	5.2
	Bound			10.5	44.9		6.5	38.0	0.1
0.1% Span 80	Free	1.7	2.8	8.6	25.0	5.9	6.5	39.3	10.2
	Bound	0.2	0.7	7.8	17.3	7.8	9.1	53.5	3.6



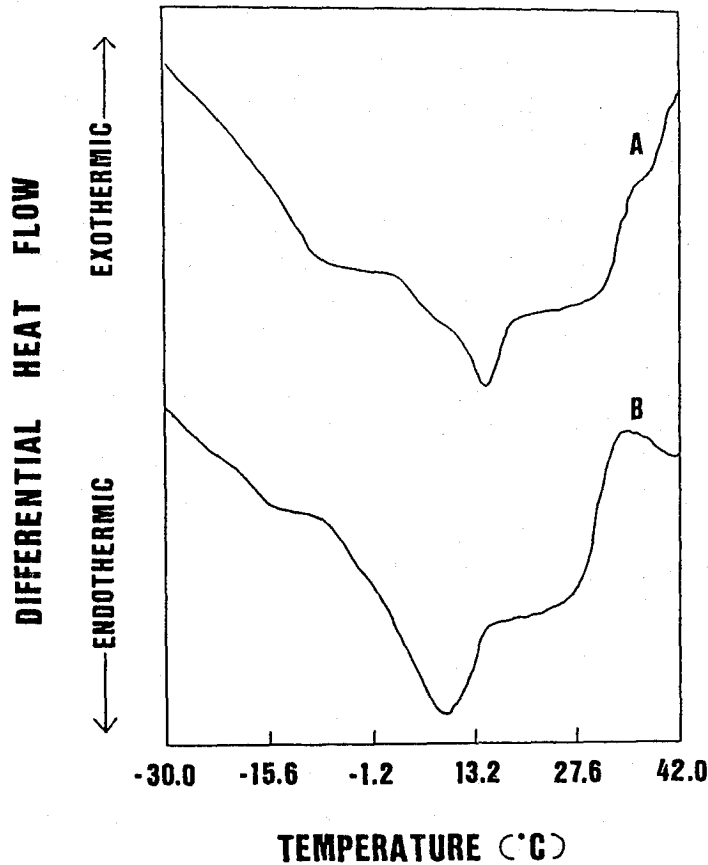


Fig. 5 Differential Scanning Calorimetric Patterns of the Lipids of *Lactobacillus bulgaricus* 1067. Lipids from the cells grown in the medium without Span 80 (A); Lipids from the cells grown in the medium with 0.1 % Span 80 (B).

また、Span 80添加培地での培養菌は、ラクトース消費能が高く、保存後の菌体内の ATP 含量も高いことを認めた (表 5)。さらに、本菌体は、Span 80無添加培地での培養菌に比較し、食塩一浸透圧ショックに対する耐性が高かった。

以上の結果より、菌体膜脂質中のオレイン酸含有量を高めることは、膜脂質の融解温度あるいは相転移温度を低下し、本菌の低温における安定性を増加させるものと推察した。また、本操作は、エネルギー源としての ATP 生成に必要な糖源となる、ラクトース透過性を促進するものと推察した。

一方、脱脂粉乳培地でのアセトアルデヒド生産性は、1067株が3022株より高かったが、培地にスレオニンを追加して培養すると、逆に、3022株のアセトアルデヒド生産性が1067株より高くな

った。これは、1067株のたんぱく質分解活性が3022株より高いのに対し、スレオニアルドラーゼ活性は、逆に3022株が1067株より高いためであることが分かった（表6）。また、本菌のスレオニンの取り込み量は、培地中のスレオニン濃度を高めると共に増加し、アセトアルデヒド生成量も増加することを認めた。

**Table 5** Changes of Bacterial Adenosine Triphosphate (ATP) Content and Lactose Utilization in the Liquid Concentrated (LC) Culture of *Lactobacillus bulgaricus* 1067 During Storage at 5 °C for 14 Days.

Addition to growth medium	Addition to LC culture	Before storage		After storage	
		Viable counts (cfu/ml)	ATP ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ )	Lactose utilized (g/L)	ATP ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ )
none	none	$5.4 \times 10^9$	$1.1 \times 10^{-8}$	9.4	$2.0 \times 10^{-10}$
	0.1% As-Na + N <sub>2</sub> <sup>a)</sup>	$5.4 \times 10^9$	$1.1 \times 10^{-8}$	7.6	$9.1 \times 10^{-10}$
0.1% span 80	none	$3.4 \times 10^9$	$8.8 \times 10^{-9}$	14.0	$2.1 \times 10^{-9}$
	0.1% As-Na + N <sub>2</sub>	$3.4 \times 10^9$	$8.8 \times 10^{-9}$	18.3	$1.9 \times 10^{-9}$

a) N<sub>2</sub> gas was bubbled into the culture supplemented with 0.1% sodium ascorbate (As-Na) for 3 min before storage.

**Table 6** Threonine Aldolase and Proteolytic Activities of *Lactobacillus bulgaricus* 1067 and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022 in Skim Milk Medium.

Strain	Threonine aldolase (U/mg protein)	Incubation time (hours)	Tyrosine value ( $\mu\text{g}$ tyrosine/g culture)
<i>L. bulgaricus</i> 1067	0.80	start	68.9
		16	144.8
		24	152.5
<i>S. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> 3022	3.33	start	68.9
		16	72.2
		24	71.6

*L. bulgaricus* 1067 and *S. lactis* subsp. *diacetylactis* 3022 were incubated in 20 % reconstituted skim milk medium at 37 °C and at 30 °C, respectively.

#### 4. *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* のジアセチル生産性の改善

クエン酸はジアセチルレダクターゼ活性を低めることから、ジアセチルの蓄積に関与していることを認めた。一方、本菌のジアセチル生成は、銅又は鉄等の金属塩添加培地で培養することにより促進された。特に、 $\text{Cu}^{2+}$ は本菌のクエン酸代謝におけるジアセチル生成活性を著しく高めた(表7)。また、高いジアセチル生成活性が残存している24時間培養菌液に $\text{Cu}^{2+}$ とクエン酸を添加し、引き続き培養すると、クエン酸の消費は低下するものの、多量のジアセチルを短時間のうちに生成した(図6)。

以上の結果より、 $\text{Cu}^{2+}$ の添加がジアセチル生成を促進するのは、 $\text{Cu}^{2+}$ がジアセチル生成活性を高めることと、クエン酸消費の低下により残存したクエン酸が、ジアセチルレダクターゼ活性を低めることの両者の作用によると推察した。また、 $\text{Cu}^{2+}$ の添加によりクエン酸消費が低下するのは、多量に生成されたジアセチルが、本菌のクエン酸取り込みを抑制する(図7)ため

**Table 7** Effects of Metal Ions on Activities of the Citrate Fermentation Pathway of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022.

Addition	Relative activity (%)			
	Citrate uptake	Citrate lyase	Diacetyl formation	Diacetyl reductase
none	100	100	100	100
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	95	212	823	94
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	96	108	159	98
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	98	113	182	96
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	96	122	194	102
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	100	100	324	97
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	93	164	253	95
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	91	116	324	104
$\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	95	133	65	92
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	102	100	306	93

The activities of citrate uptake, citrate lyase and diacetyl reductase were assayed as described under "Materials and Methods", except that the reaction mixture contained 0.05 mM metal ion. Diacetyl formation activity was assayed as described under "Materials and Methods", except that the reaction mixture contained 0.1 mM metal ion.

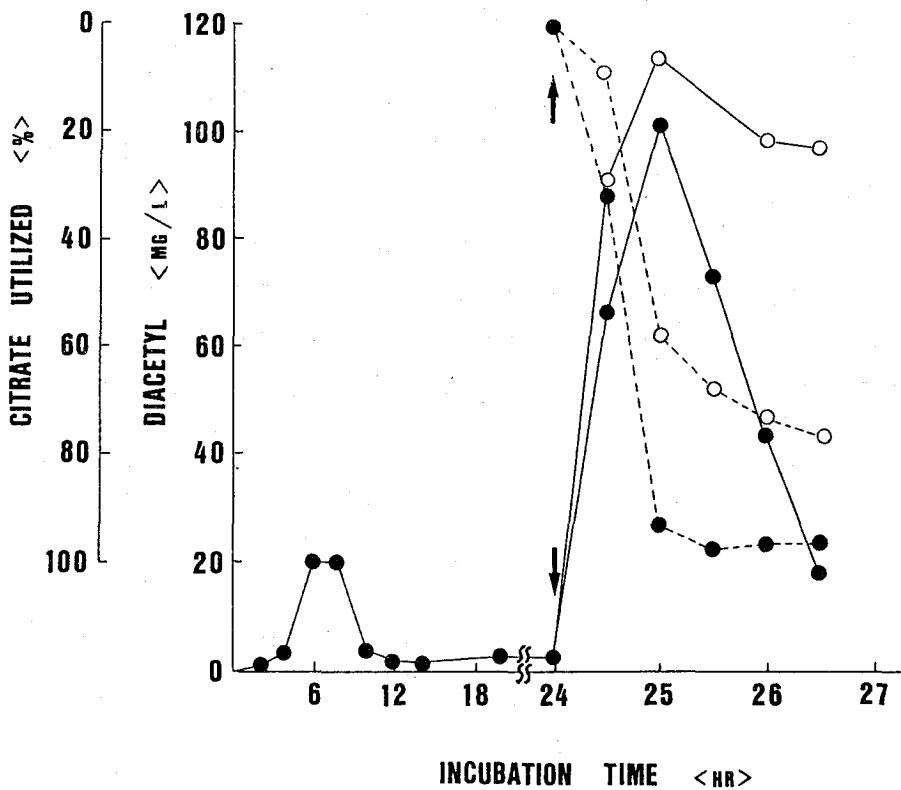


Fig. 6 Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  on Diacetyl Production and Citrate Utilization by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022. *S. lactis* subsp. *diacetylactis* 3022 cells were incubated in MRS medium at  $30^\circ\text{C}$  for 24 hours. At 24 hours incubation, indicated by arrows, 1 ml of MRS medium with and without 11 mM  $\text{CuCl}_2$ , containing 3.5% triammonium citrate, was added to 10 ml of the culture, respectively. After the addition of MRS medium, diacetyl accumulation (solid lines) and citrate utilization (broken lines) were determined. Medium supplemented with (○) and without (●)  $\text{Cu}^{2+}$ .

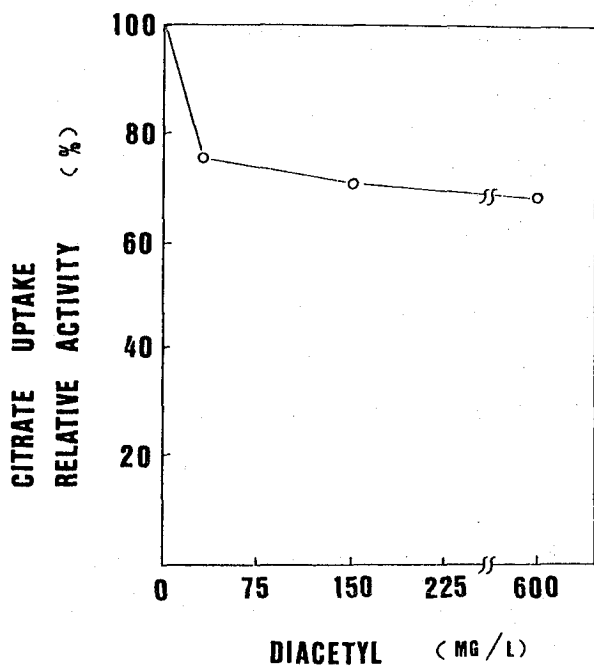


Fig. 7 Effect of Diacetyl on Citrate Uptake Activity of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* 3022 (○).

Table 8 Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on Oxygen Uptake During the Reaction for Diacetyl Formation from Pyruvate.

Addition to reaction mixture	Oxygen uptake <sup>a)</sup> ( $\mu\text{l O}_2 / 30\text{min}$ )
none	0.14
0.1mM $\text{Cu}^{2+}$	0.14

a) Oxygen uptake was determined after the reaction at 30°C for 30 min as described under "Materials and Methods".

あることを認めた。

一方、 $\text{Cu}^{2+}$ をジアセチル生成活性測定時に加えても、酸素吸収量が高くならなかった(表8)。また、 $\text{Cu}^{2+}$ を加え、窒素気流下で酸素と接触させずに反応させると、ジアセチル生成量が更に高くなった(表9)。さらに、無細胞抽出液を加熱処理すると、 $\text{Cu}^{2+}$ を添加してもジ

Table 9 Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and Atmosphere on Diacetyl Production.

Atmosphere	Addition to reaction mixture	Diacetyl (mg/L)
Air	-	9.9
	+	21.7
$\text{N}_2$	-	15.4
	+	28.0

a) 0.1 mM  $\text{CuCl}_2$  : added (+), not added (-).

アセチル生成が殆ど認められなかった。

以上の結果より、ピルビン酸よりジアセチルに至る代謝において、 $\text{Cu}^{2+}$ は、 $\alpha$ -アセト乳酸と酸素との反応に作用するのではなく、活性アセトアルデヒドを経由する経路を触媒する、酵素を活性化することが結論できた。

## 5. *Leuconostoc cremoris* のジアセチルおよびエタノール生産性の改善

5004株はジアセチル生成活性が低いのにに対し、ジアセチルレダクターゼ活性が著しく高いことから、培地中へのジアセチルの蓄積が少なかった。しかし、 $\text{Cu}^{2+}$  添加培地で培養すると、3022株と同様にジアセチル生成量が高くなった。

一方、培養初期では、好気培養菌が嫌気培養菌よりエタノール生成量が低かったが、培養後期では、エタノール生成量はいずれも著しく増加した。培養初期では、好気培養菌が嫌気培養菌より、NADHオキシダーゼ活性が高いのにに対し、アルコールデヒドロゲナーゼ活性が低かった。また、乳酸生成量は嫌気培養菌が高く、乳酸デヒドロゲナーゼ活性も高かった。更に、培養後期では、何れの条件下でも、NADHオキシダーゼ活性が低減するのに対し、アルコールデヒドロゲナーゼ活性が増加した(表10)。

すなわち、培養初期では、好気条件下においてNADHオキシダーゼによる $\text{NAD}^+$ の再生が起り易いので、アセトアルデヒドがエタノールに変換される際、もしくはピルビン酸が乳酸に変換される際に伴う、 $\text{NAD}^+$ の再生系に対する依存度が低いものと推察した。また、培養後期では、NADHオキシダーゼ活性が低下し、アルコールデヒドロゲナーゼの触媒する反応系による $\text{NAD}^+$ の再生が促進され、結果としてエタノール生成量が高くなるものと推察した。

Table 10 Activities of NADH Oxidase, Alcohol Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase of *Leuconostoc cremoris* 5004.

Activity	Head space	Incubation time (hours)	
		6	24
NADH oxidase (mU/mg protein)	Air	206	45
	CO <sub>2</sub>	135	29
Alcohol dehydrogenase (U/mg protein)	Air	0.9	1.4
	CO <sub>2</sub>	1.1	1.7
Lactate dehydrogenase (U/mg protein)	Air	4.2	6.8
	CO <sub>2</sub>	5.2	7.4

*L. cremoris* 5004 cells were incubated in MRS medium at 30°C, at pH 6.5.

## 結 論

*B. longum* 6001および*L. bulgaricus* 1067の生残性には、それぞれH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>耐性、および菌体膜脂質の脂肪酸組成と菌懸濁液のEhが関与することを指摘すると共に、これらの要因の制御による、乳酸菌の生残性改善の可能性を明らかにした。また、乳酸菌の生成する主要香気成分のアセトアルデヒド、ジアセチル、エタノールのなかで、*L. bulgaricus* 1067のアセトアルデヒド生成には、たんばく質分解活性と培地中のスレオニン濃度、*S. lactis* subsp. *diacetylactis* 3022と *L. cremoris* 5004 のジアセチル生成には、Cu<sup>2+</sup>等の金属イオン、もしくは残存クエン酸によるジアセチルレダクターゼの活性低下作用が影響することを認めた。さらに、Cu<sup>2+</sup>は、ピルビン酸よりジアセチルに至る代謝において、活性アセトアルデヒド経由の経路を触媒する、酵素を活性化することを明らかにした。

一方、*L. cremoris* 5004のエタノール生成促進には、アルコールデヒドロゲナーゼの補酵素である、NADの再生系が関与することを示唆した。

## 審査結果の要旨

乳用乳酸菌のスターターは発酵乳製品の製造において、最も重要な役割を演ずるが、スターター乳酸菌の活性を維持し、優れた香気を産生させるための有効な方策が、乳業界では求められていた。本研究は発酵乳製品の製造に多用される代表的なスターター乳酸菌について、その生残性におよぼす要因ならびにその産生香気成分の生成促進に関与する要因の解析を通じて、乳酸菌スターターの改善を試みたものである。

まず著者は、*Bifidobacterium longum*および*Lactobacillus bulgaricus*の生残性を取り上げて、これらの生残性には、それぞれ過酸化水素耐性および菌体膜脂質の脂肪酸組成と菌懸濁液の酸化還元電位が関与することを指摘する一方、これらの要因制御によって乳酸菌の生残性の可能であることを明らかにすることに成功した。

ついで、乳酸菌の生成する主要香気成分のアセトアルデヒド、ジアセチルおよびエタノールのなかで、*L. bulgaricus*のアセトアルデヒド生成には、タンパク質分解活性と培地中のスレオニン濃度が、また、*Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*と*Leuconostoc cremoris*のジアセチル生成には、 $\text{Cu}^{+2}$ イオンなどの金属イオンもしくは残存クエン酸によるジアセチルレダクターゼの活性低下作用が影響することを明示した。

そして、さらに $\text{Cu}^{+2}$ はビルビン酸からジアセチルに至る代謝において、活性アセトアルデヒド経路の経路を触媒する酵素を活性化するものであることを指摘した。また、*L. cremoris*のエタノール生成促進には、アルコールデヒドロゲナーゼの補酵素 $\text{NAD}^+$ の再生系の関与することを示唆した。

以上の成果は、乳業技術の発達に寄与するところが大きいばかりでなく、学問的にも幾多の新知見を含み、関係領域の科学の進歩に貢献するところが多大である。よって審査員一同は本研究に対し、農学博士の学位を授与するに値するものと認定した。