

氏 名(本籍) 宮 本 拓

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 3 4 1 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 2 月 12 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 ラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* の
分離と機能の応用に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 足立 達 教授 勝野 正則

助教授 伊藤 敏敏

論文内容要旨

自然界から優良な乳酸菌を純粋分離し、これをスターターに用いて良質な発酵乳製品を安定的に製造する試みは古くからなされてきている。最近では、単に発酵乳製品だけでなく、より広範な食品の発酵に、乳酸菌のもつ機能を応用する技術が進みつつある。この場合、発酵用食品原料に適した乳酸菌の探索が、食糧資源の利用の上から重要な意味をもつと考えられる。しかしながら、豆類を原料とする豆乳の発酵食品化については、それに適した乳酸発酵に関する知見に乏しく、その乳酸発酵の検討に着手したのが、本研究の端緒である。

そこで、第1章においては、豆乳の乳酸発酵に適した菌株を新たに探索する目的で、植物に由来する野生の乳酸菌を重点的に分離し、豆乳発酵に応用可能な *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* を選抜した。このラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* はラクトース発酵能を欠くために、本来の機能が過少評価されていたものと考えられ、牛乳の発酵はもとより、食品の加工に積極的に応用したという報告がみられなかった菌種である。

従って、第2章では、分離、同定されたラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* の培養的および代謝的諸性状を調べて、食品の加工に応用する場合の基礎的な知見を明らかにした。第3章では、前章において追求した情報をもとに、この菌株を用いたヨーグルト様豆乳食品を製造するための基礎技術を確立した。さらに第4章では、この菌株にラクトース発酵性の機能を付与して、牛乳の発酵にも適用可能な変異株の作出を試みた。

以上、4項目に大別される各研究の概要は次のとおりである。

1. 豆乳発酵用乳酸菌の探索とラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* の分離

一般に健全な植物体の表面においては乳酸菌は増殖しないものといわれている。しかし果実の果肉部や作物の汁液は、乳酸菌の好適な培養基と考えられ、これらに生息する乳酸菌の代謝特性は、従来の乳業用乳酸菌とは異なることが推定された。そこでパイナップル、パパイヤ、サトウキビ、牧草などの果実や栽培植物を供試試料とし、乳酸菌選択培地を用いて、47試料から399株の乳酸菌を分離した。分離株の代謝能から実用的に有用と思われる菌株を選抜するために、グルコース添加脱脂乳培地での酸生成、タンパク質分解能および芳香産生能を調べ、分離源も考慮に入れて、代謝能の高い菌株を合計31株選抜した。

選抜した菌株を Bergey's Manual (第8版) に基づいて同定した結果、*Lactobacillus* 属14株、*Streptococcus* 属14株、*Leuconostoc* 属3株が得られた。菌株としては、植物界に広く分布しているといわれる *Lactobacillus plantarum*、*Streptococcus faecalis*、*Leuconostoc mesenteroides* が多く分離された。選抜した菌株の応用上の重要な性質として、大豆乳培地での生酸活性を調べたところ、これらの菌株の中には、対象として用いた乳酸菌に比べて、同等もしくはそれ以上の生酸活性を示すものもあった。

とくに沖縄県石垣島の熱帯農業研究センター内で採取した熱帯果実の一種パンレイン試料では、その果皮のとれた果肉部に付着、増殖していた乳酸菌が認められ、これを BCP 加プレートカウント寒天培地の 10^5 倍希釈の混積平板から分離同定した *Lactobacillus casei* No 34143 は、同種の標準株に比べて、大豆乳培地での生酸性とジアセチル生成能が高く (Table 1), 豆臭改善を目指した豆乳発酵食品の製造に、応用の可能性が大であった。

Table 1 Effect of incubation time on acid and diacetyl production in soy milk incubated at 35°C with *Lactobacillus casei* No 34143 and IFO 3953

Incubation time (hr)	Acidity (%)		Diacetyl (ppm)	
	34143	3953	34143	3953
4	0.02	0.02	0.21	0.32
8	0.04	0.05	0.93	0.85
12	0.23	0.04	2.13	1.18
16	0.65	0.04	1.18	0.70
20	0.74	0.02	0.74	0.53
24	0.77	0.02	0.80	0.22

Table 2 に示すように、この菌株は、グラム陽性の比較的長い連鎖をなす桿菌で、ホモ型乳酸発酵をし、15°Cで生育可能である。牛乳を凝固せず、L(+)-乳酸を生成する。またリボース、スクロース、セロビオース、マンニトールなどを発酵するが、アラビノース、ラムノース、ソルボース、ラクトース、ラフィノース、デンプンなどを発酵しないので、*Lactobacillus casei* の亜種であるラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* と同定され、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 と呼ぶことにした。標準株の *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* IFO 3953 は、Table 2 の糖類のうちイヌリン発酵性において陰性であった。

2. ラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* の培養的機能

Lactobacillus casei subsp. *alactosus* 34143 の発酵食品への適用を考慮して、この菌株の培養のおよび代謝的諸性質を検討した。大豆乳、脱脂乳およびこれらの混合培地での生酸性は、大豆乳のみの場合が最も高く、脱脂乳90%以上の混合培地では酸生成の増加はみられなかった。

また各種糖類やクエン酸塩、ピルビン酸塩を基質として、生菌体懸濁液による乳酸およびジアセチルの生成能を調べたところ、乳酸の生成はグルコースを基質とした pH 6.0~8.0 の範囲で高く、ジアセチルの生成はピルビン酸塩を基質とした pH 6.0以下において高かった。グルコースからの乳酸生成およびピルビン酸塩からのジアセチル生成の至適温度は39°C前後であった (Fig. 1)。

Table 2 Differential characteristics of *Lactobacillus casei*
No 34143

Morphology	Rod
Gram's staining	+
Reduction of nitrate	-
Catalase test	-
Gas from glucose	-
Growth at 15 °C	+
Growth at 45 °C	-
Ammonia from arginine	-
Hydrolysis of hippurate	+
Coagulation of milk	-
Configuration of lactic acid	L(+)
Carbohydrate fermentation:	
Arabinose	-
Xylose	-
Rhamnose	-
Ribose	+
Sorbose	-
Glucose	+
Mannose	+
Fructose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Maltose	+
Cellobiose	+
Lactose	-
Trehalose	+
Melibiose	-
Raffinose	-
Melezitose	+
Stachyose	-
Starch	-
Inulin	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
Inositol	+
Esculin	+
Salicin	+
Amygdalin	+
Gluconate	+

+ indicates positive. - indicates negative.

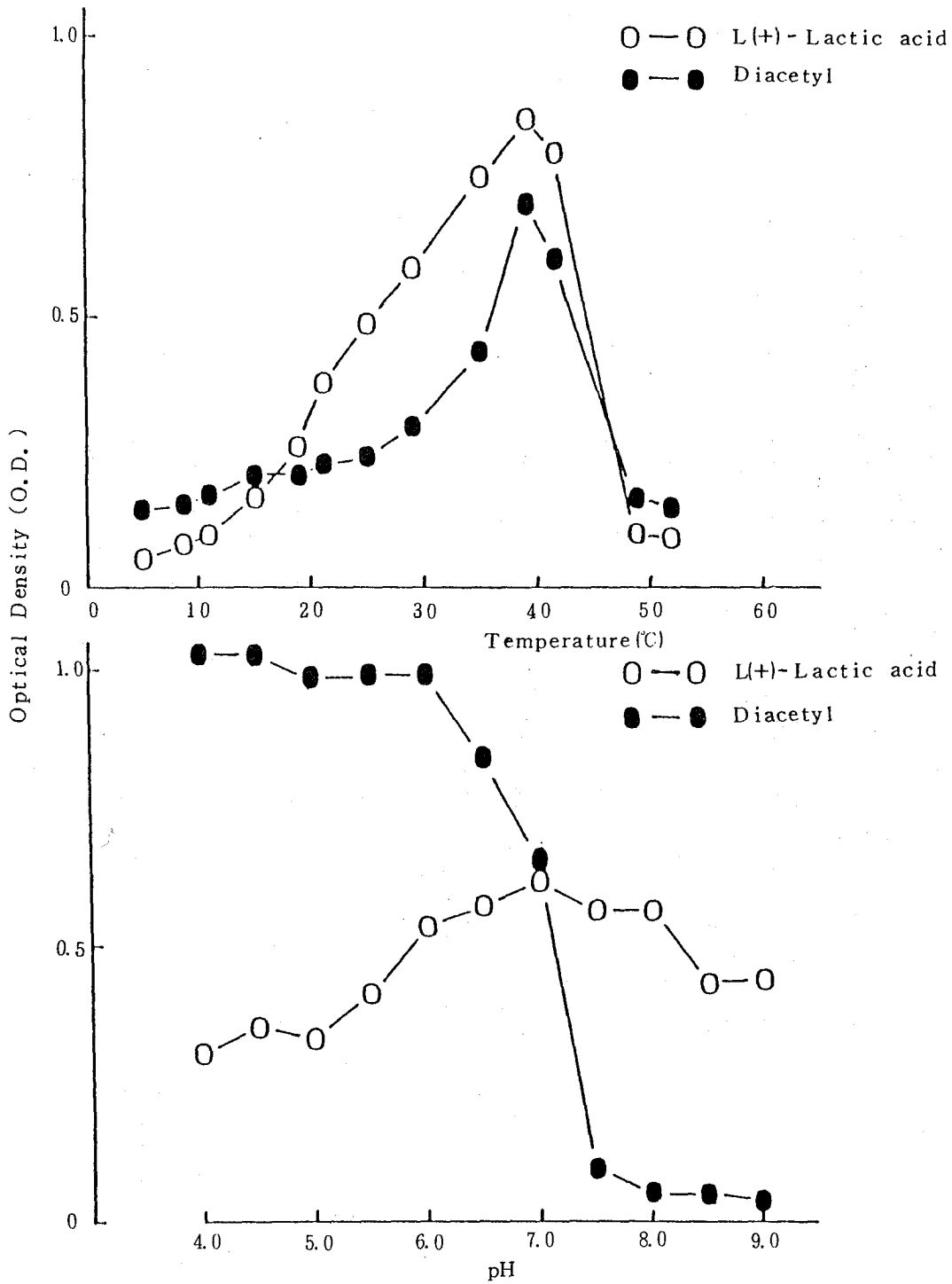


Fig. 1 Effect of temperature and pH on the production of L(+)-lactic acid and diacetyl by cell suspensions of *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143.

しかしクエン酸塩からのジアセチルの生成はみられなかった。実際にクエン酸ナトリウムを含む液体培地での培養中のクエン酸含量はほとんど変化がなく、対照として用いた *Lactobacillus plantarum* ではクエン酸の消費がみられた。この場合のジアセチルとアセトイン含量は、*Lactobacillus plantarum* では培養24時間目までかなり増加するが、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 ではほとんど変化がみられなかった。

これらの菌株のクエン酸透過酵素およびクエン酸分解酵素の活性を、生菌体懸濁液や無細胞抽出液を用いて検討したところ、対照の *Lactobacillus plantarum* や *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* に比べて、これらの酵素活性はほとんどみられず (Table 3), *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 のクエン酸代謝に関係する酵素系は非常に微弱あるいはないものと推定された。

Table 3 Citrate permease and citritase activity of some lactic cultures

Cultures	Uptake of citrate by intact cells (mg/ml medium)	Breakdown of citrate by cell-free extracts ^{a)} (Absorbance at 287nm)
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> 34143	0.09	0.140
<i>L. plantarum</i> 6-2-01	0.35	0.570
6-2-14	0.32	0.425
<i>Str. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> N-7	0.39	0.481

a) Cell-free extracts treated with Dowex 1 were used in estimating citritase activity.

一方、脱脂乳培養中の有機酸の消長をガスクロマトグラフィーで測定したところ、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 は微量の乳酸およびギ酸の生成と、他の菌種よりも多い酢酸の生成を示すのが特徴であった。

3. ラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* の豆乳発酵への応用

熱帯の未利用資源植物の一つである四角豆を供試試料として、その発酵食品化に資する目的から、大豆乳と同様に調製した四角豆乳培地を用いて、ヨーグルト様豆乳食品の試作実験を行った。

大豆乳および四角豆乳は0.5%ラクトースを含むものと、含まない培地を使用し、また菌株は *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 と *Lactobacillus helveticus* B-1 の単独およびそれらの混合菌を用いた。ラクトースを含まない豆乳培地では、*Lactobacillus helveticus* 単独のときはほとんど酸生成がみられなかった (Fig. 2)。しかしラクトースの添加で酸の生成量が増加した。大豆乳と四角豆乳での酸生成は、いずれの発酵条件でも同じような傾向を示した。

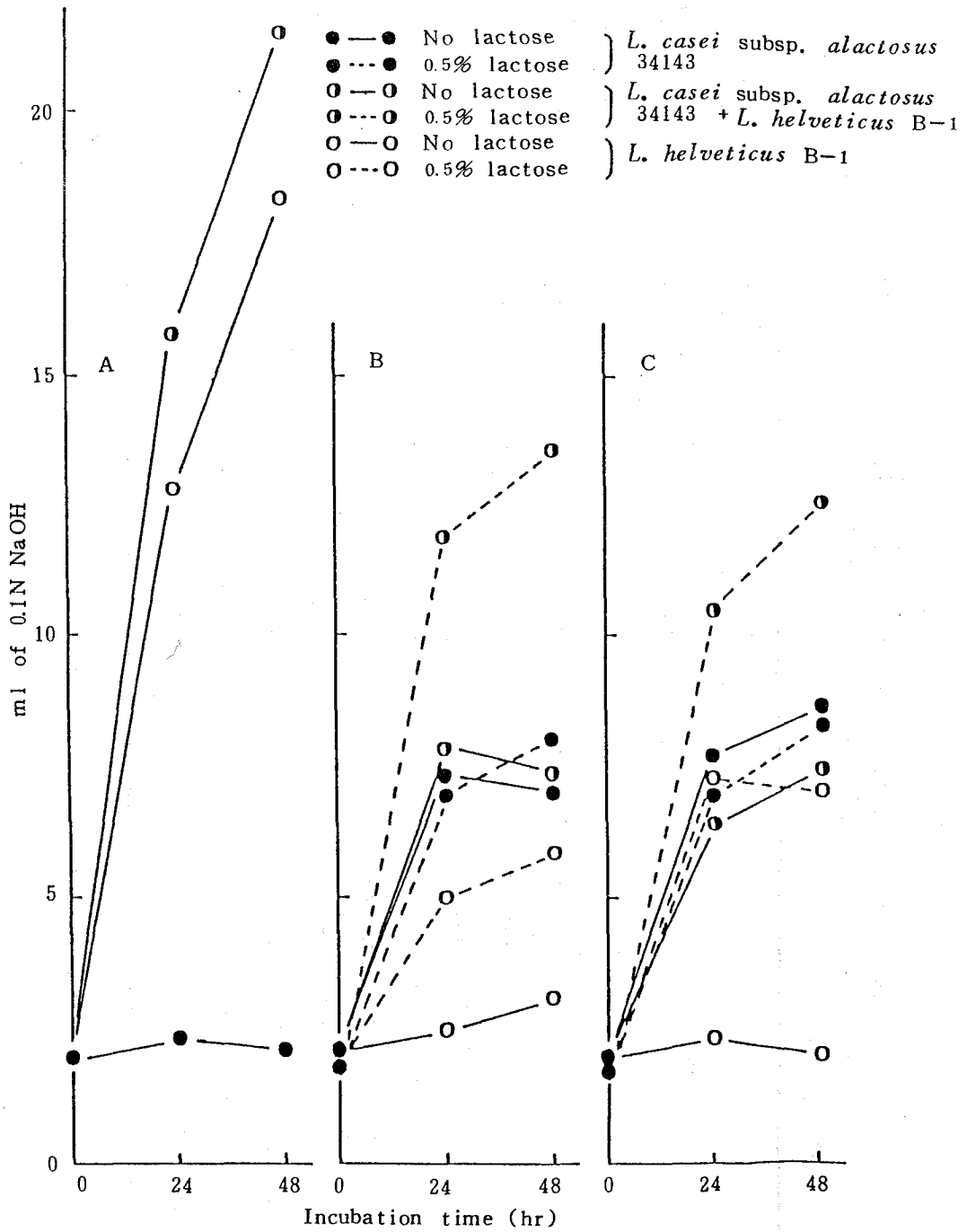


Fig. 2 Effect of lactose addition on acid production in skim milk(A), milk from defatted soybean flour(B) and winged bean(C) by some lactobacilli at 39°C.

Table 4 Effect of lactose and sodium pyruvate on diacetyl and acetaldehyde production in milk from winged bean and defatted soybean flour by some lactobacilli incubated at 39°C for 24hr

Sample	Diacetyl (p. p. m.)		Acetaldehyde (p. p. m.)				
	34143a) B-1 b)	34143 + B-1	34143 B-1	34143 + B-1			
Winged bean	No addition	0.3	trace	1.0	0.6	0.2	0.7
	0.5% lactose	0.1	trace	0.4	0.1	1.2	4.6
1% Na pyruvate +	0.5% lactose	6.1	trace	7.8	trace	4.6	2.4
Defatted soybean flour	No addition	0.6	trace	0.9	0.4	0.1	trace
	0.5% lactose	0.3	trace	0.7	0.1	1.2	1.7
1% Na pyruvate +	0.5% lactose	6.4	trace	7.3	0.6	5.6	5.0
Skim milk		0.1	trace	0.2	trace	3.8	3.8

a) *L. casei* subsp. *alactosus* 34143. b) *L. helveticus* B-1.

豆乳培地で最も高い酸生成を示したものは、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* と *Lactobacillus helveticus* の混合菌で発酵したラクトース含有豆乳培地であった。

同様の培地でジアセチルとアセトアルデヒドの生成能を検討したところ、ジアセチルは *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* より生成され、一方、アセトアルデヒドは *Lactobacillus helveticus* より主に生成された (Table 4)。

Lactobacillus casei subsp. *alactosus* 34143 を用いた四角豆乳からのヨーグルト様食品の製造試験の結果、ラクトース 0.5%、ピルビン酸ナトリウム 0.1%、スクロース 10%、ゼラチン 0.5% を含む四角豆乳を、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* と *Lactobacillus helveticus* の混合スターターで発酵するのが望ましい方法であった (Fig. 3)。すなわちこの方法により、ヨーグルト様フレーバーとしてのジアセチルとアセトアルデヒドは、それぞれ *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* および *Lactobacillus helveticus* から生成された。とくに *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* からのジアセチル生成は、ピルビン酸塩を添加することによって促進された。また四角豆乳へのラクトースの添加は、*Lactobacillus helveticus* の生育に有効であり、結果としてアセトアルデヒドの生成をもたらし (Table 4)。さらにスクロースの添加は発酵液の甘味を調整する上で、まだゼラチンの添加は発酵液のカードに強度をもたすのに必要であった。この四角豆乳と脱脂乳を等量混合して製造したヨーグルト様製品は、その嗜好性を一層高めることができた。このことから、タンパク質と脂質に富み、熱帯の大豆といわれる四角豆のこの種の有効利用は、熱帯地域の人々の栄養改善に資することが大きいと考えられる。

上記の *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 の大豆乳培地でのすぐれた酸生成能は、大豆乳に含まれる糖や窒素化合物などの組成に起因するものと推定された。この点を明らかにする目的で、大豆乳分画物の乳酸菌に対する発育促進作用を調べた。

まず大豆乳から調製した豆乳ホエーをエタノールで溶剤分別し、得られたエタノール沈殿画分を 0.5% グルコースを含む脱脂乳培地に加え、各種乳酸菌に対する発育促進効果を酸生成から検討した (Table 5)。その結果、エタノール沈殿画分は、*Lactobacillus casei* および *Lactobacillus acidophilus* の供試菌株に対して顕著な酸生成の促進効果を示した。また *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 の Lac⁺ 変異株である N-25 株に対しても促進効果を示したことから、大豆乳には乳酸菌の発育に有効な糖以外の物質も含まれていると考えられた。

そこで、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 を試験菌とする微生物学的検定法により、発育促進活性を示す物質の分離を試みた結果、エタノール沈殿画分のスルフォプロピルセファデックス C-25 カラムによる溶出曲線から活性を示す 3 つのピークを得た。このうち最も高い活性を示したピークの薄層クロマトグラムは、ニンヒドリン反応陽性の単一スポットであり、その紫外吸収スペクトルは 210 と 280 nm 付近に吸収極大をもち、分子量は約 1,150 ダルトンのペプ

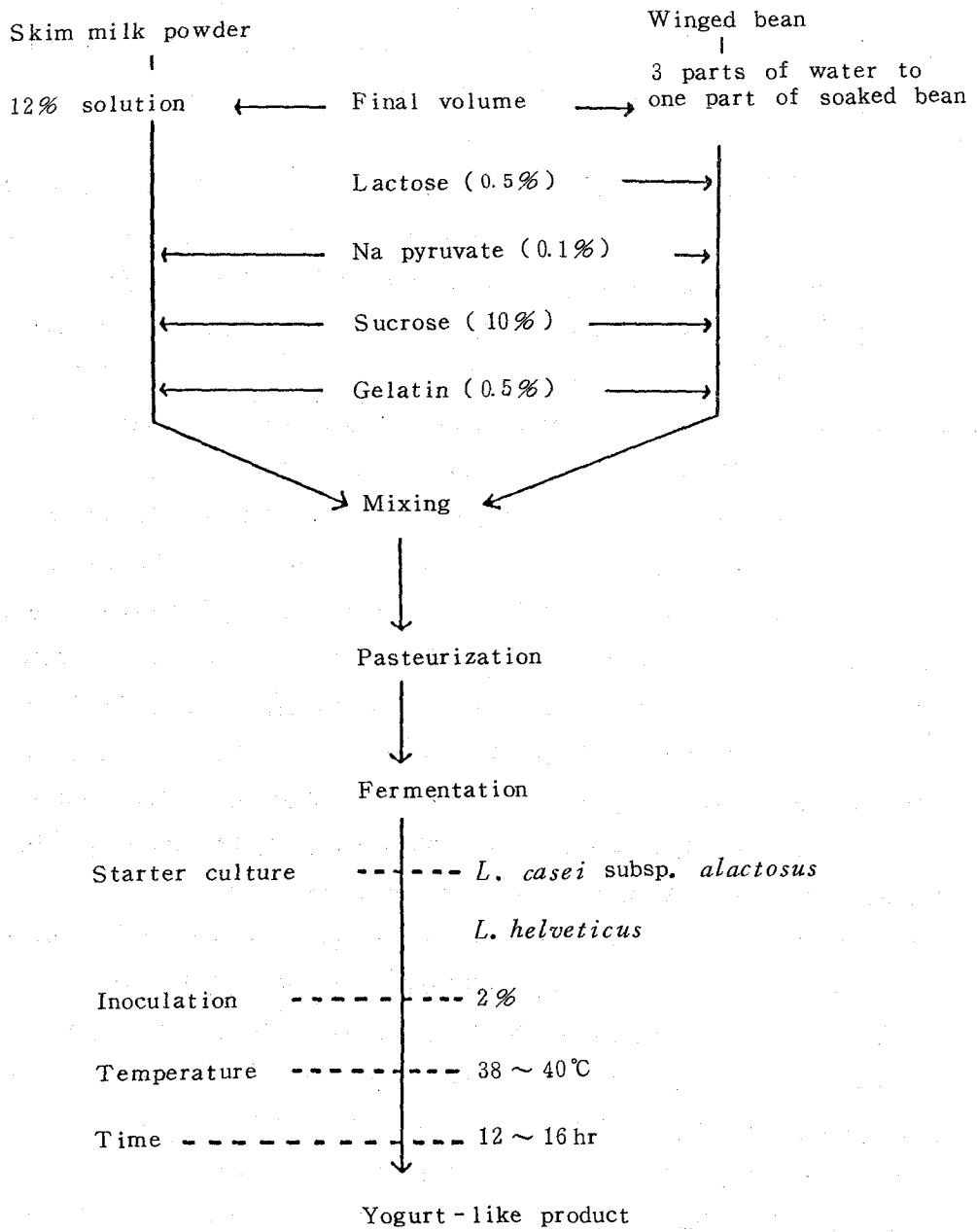


Fig.3 Method for production of yogurt-like product from winged bean milk.

Table 5 Effect of growth-stimulating fraction on acid production of some lactic cultures incubated in skim milk^a

Lactic culture ^b	Net acid production (ml of 0.1N NaOH) ^c		
	Medium(A) ^d	Medium(B) ^e	(B) - (A)
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> 34143	1.40	5.60	4.20
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> N-25	2.43	7.25	4.82
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> L-14	2.90	5.70	2.80
<i>L. helveticus</i> B-1	11.30	9.40	-1.90
<i>L. bulgaricus</i> B-5b	11.10	11.30	0.20
<i>L. acidophilus</i> L-54	5.85	9.95	4.10
<i>Str. thermophilus</i> 510	6.95	7.05	0.10
<i>Str. cremoris</i> H-61	4.25	3.60	-0.65
<i>Str. lactis</i> 527	6.15	6.75	0.60
<i>Str. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> N-7	5.40	5.95	0.55

a) Ethanol precipitate obtained from soybean whey (total protein in amounts of 7.30mg per ml) was used as growth-stimulating fraction.

b) Incubated for 24hr at 35°C.

c) Net acid production=(acid production in the presence of growth-stimulating fraction)-(acid production in the blank).

d) Medium(A) is skim milk containing 0.5% glucose.

e) One ml of growth-stimulating fraction was added to 9ml of Medium(A).

チドと考えられた。また大豆乳には、単離されたこの物質以外にも *Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* の発育を促進するニンヒドリン反応陽性の物質が多数存在することが推定された。

以上の検討結果から、大豆乳中のペプチドを始めとする窒素化合物および主要構成糖であるスクロースの存在によって、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 は大豆乳培地での生育が促進されると推論された。

4. ラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* のラクトース発酵能の機能開発

Lactobacillus casei subsp. *alactosus* 34143 はラクトース発酵能を欠くために、牛乳培地では酸生成がみられず、乳業用乳酸菌として応用する場合、ラクトース発酵性をこの菌株に付与する必要がある。そこで、まず突然変異剤の利用によるラクトース資化菌株の分離を試みた。

供試菌をニトロソグアニジン (NTG) で処理し、50%以下の生存率を示した平板より合計107株の NTG 処理株を鈎菌し、脱脂乳培地でそれらの生酸活性を調べたところ、脱脂乳を凝固し、ラクトース発酵能を獲得した変異株が2株分離された。この Lac⁺ 変異株は4年を経過した現在もその性質が安定であり、親株と同一のプラスミド組成を示したことから、それらのラクトース代謝は、染色体上の遺伝子に支配されていると考えられた。しかしラクトース発酵性変異株を再現性高く得るには、分子育種学的手法を導入して菌株の改良を試みる必要があった。

そこで、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 のストレプトマイシン (Str^r) およびペニシリン耐性株 (Pen^r) を分離し、それらを受容菌として、接合法により Lac⁺ 変異株の作出を検討した。

その結果、受容菌と供与菌 *Lactobacillus bulgaricus* 7235 との交配で得られた Lac⁺ Str^r / Pen^r の交配株、*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* IFO 3425 との Lac⁺ Str^r / Pen^r 株 および *Streptococcus thermophilus* 18235 との Lac⁺ Pen^r 株を、3回の繰り返し試験で再現性高く得ることができた。それらの接合頻度は、供与菌当り 1.6×10^{-2} から 1.1×10^{-5} の範囲であった。得られた交配株は大部分が脱脂乳を凝固し、ラクトース発酵能は安定であった。また交配株の糖類発酵性やその他の性状試験から、受容菌や供与菌と異なる性質を発現した交配株や、受容菌のもつ性質を一部欠落した交配株も認められた (Table 6)。しかしそれらの形態はいずれも受容菌と同一であった。これらのラクトース発酵性変異株の出現は、自然突然変異、形質導入および形質転換によるものではなく、受容菌と供与菌の接合により、ラクトース発酵性が発現したものと考えられた。

一方、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143 のストレプトマイシン耐性株を 0.9 M ラクトースで高張にしたプロトプラスト緩衝液中で、細胞壁溶解酵素のリゾチームとムタノリシンを併用してプロトプラスト化し、0.5 M マルトースあるいは 0.25 M マルトースと 0.25 M スクロースを組み合わせた再生培地上で、高い再生率 (約20%) を示す条件が得られた (Table 7)。

Table 6 Properties of selected markers and other fermentative characters in recipient, donor and their recombinant of lactic acid bacteria used for mating trials

Designation of strains	Selected markers				Other fermentative characters ^{a)}			
	Lac	Str	Pen	Rha	Sor	Mel	Inu	
Recipient								
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> 34143S	-	r	s	-	-	+	+	+
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> 34143P	-	s	r	-	-	+	+	+
Donor								
<i>L. bulgaricus</i> 7235	+	s	s	-	-	-	-	-
143-SB-72	+	r	s	+	+	+	+	+
Recombinant								
143-SS-72	+	r	s	+	+	+	+	+
143-PS-72	+	s	(r) ^{b)}	+	+	+	+	+
Donor								
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> IFO3425	+	s	s	+	+	+	+	-
143-SB-34	(+) ^{b)}	r	s	-	-	+	+	+
Recombinant								
143-SS-34	+	r	s	+	+	+	+	+
143-PS-34	+	s	r	-	-	-	-	+
Donor								
<i>Str. thermophilus</i> 18235	+	s	s	-	-	-	-	-
143-PB-18	+	s	r	-	-	-	-	+
Recombinant								
143-PS-18	+	s	r	-	-	±	±	+

a) Rha, Sor, Mel and Inu indicate rhamnose, sorbose, melezitose and inulin, respectively.

b) (r) and (+) indicate that penicillin-resistance and lactose fermenting ability were lost after several transfers in modified Elliker broth.

Table 7 Influence of various sugars as an osmotic stabilizer on protoplast regeneration^{a)}

Strains used	Frequency of protoplast regeneration(% ^{b)})			
	0.5M Maltose	0.5M Sucrose	0.3M Raffinose	0.25M Maltose and 0.25M Sucrose
<i>L. casei</i> subsp. <i>alactosus</i> 34143 S	20.82	$<8.45 \times 10^{-3}$	3.01	19.18
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> IFO 3425	4.78	$<7.97 \times 10^{-3}$	1.59	1.59
<i>L. bulgaricus</i> 7235	$<1.72 \times 10^{-3}$	$<1.72 \times 10^{-3}$	$<1.72 \times 10^{-3}$	$<1.72 \times 10^{-3}$
<i>Str. lactis</i> 527	0.33	$<9.85 \times 10^{-3}$	$<9.85 \times 10^{-3}$	1.03
<i>Str. lactis</i> KM	3.35	1.18	3.48	2.59
<i>Str. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> N-7	14.77	5.42	5.41	16.32

a) Cells were suspended in protoplast formation buffer containing 0.9M lactose.

b) (Colonies on regeneration medium in protoplast solution)-(Colonies on control medium in protoplast solution) $\times 100$
 (Colonies on control medium in untreated solution)-(Colonies on control medium in protoplast solution)

同様の条件で調製した *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* IFO 3425 のプロトプラス
トとの融合も試み、菌種内での Lac⁺Str^r の融合株を作出することもできた。この成功は、さら
に他の菌種や菌属間でのプロトプラスト融合によるラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei*
の変異株作出に、一層の可能性の拡大を期待させるものである。

以上、これらの一連の研究結果は、乳酸菌の機能を食品加工に応用した製造技術の開発に寄与す
るものと考えられる。またラクトース非発酵性 *Lactobacillus casei* のラクトース発酵能を開
発する試みは、乳酸菌の代謝能の強化とその性質の安定化、あるいは効率的発現を目指した乳業用
乳酸菌の育種の分野において、新たな乳酸菌利用の可能性を導くものである。

審査結果の要旨

東南アジア・西インド諸島などに分布する四角豆は、熱帯産の未利用資源として、テンペーや発酵豆乳の製造原料に応用される可能性が高く、その開発研究が発展途上国への貢献は勿論、先進国の食品の新製品創出のために、先進工業国において広く研究されるようになりつつある。本論文は四角豆の利用上、実施の可能性の大きな発酵製品開発に必要なラクトース非発酵性乳酸菌の探索、分離、同定と本菌による発酵豆乳製造への応用の可能性ならびに本菌の長所を乳製品へ拡張するための育種学的検討を行ったものである。

本論文の著者はまず、多数の熱帯植物の試料から約400株の乳酸菌を分離し、分離株の代謝能の検討結果から、*Lactobacillus*属14株、*Streptococcus*属14株、*Leuconostoc*属3株を選抜したが、最終的には大豆乳での生酸性と香気物質としてのジアセチルの生成能の高い一菌株を分離することに成功した。そして、この菌株について各種の性状の比較から、本菌を*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus* 34143と同定した。

つぎに著者は、この*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus*について、発酵豆乳への応用に資するため生酸性およびジアセチル生成能の産動要因の解析を行い、本菌は他の乳酸菌と異なり、多量の酢酸と少量の乳酸およびギ酸の生成をグルコースの存在下で行い易く、ジアセチルの生成はピルビン酸から生成するが、クエン酸からは生成しないことを明らかにした。そして四角豆から発酵豆乳を本菌を適用して製造し、大豆乳との比較から、本菌によって四角豆から豆乳臭をマスクした優れた発酵豆乳の製造しうることを示し、さらに豆乳中のペプチドやスクロースが本菌の生育促進因子として働くことを証明した。

最後に著者は、本菌にラクトース発酵性を付与して、発酵乳製品への応用を図るために突然変異剤の利用のみならず、接合伝達ならびにプロトプラスト融合を始めて本菌に適用し、ラクトース発酵性を有する本菌の育種に成功している。

以上の結果は幾多の新知見を含み、学術上のみならず、産業面にも貢献するところ大である。よって、審査員一同は著者の業績に対して農学博士の学位に授与するに価するものと判定した。