

ESR
Materi Workshop

Materi Workshop

BAKTERI ASAM LAKTAT : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI

Disusun oleh :

Dr. Endang S. Rahayu
Dr. S. Margino

Diselenggarakan di :
PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, 13 & 14 Juni 1997

Bakteri Asam Laktat : Isolasi dan Identifikasi

Pendahuluan

Bakteri asam laktat pertama kali ditemukan oleh Pasteur pada tahun 1857 saat mempelajari kerusakan anggur (*wine*), yang berubah menjadi asam. Sedang istilah *Milchsauerbacillus* yang diartikan sebagai bakteri batang penghasil asam yang menyebabkan keasaman pada susu, pertama kali dikemukakan oleh Hueppe tahun 1884. Bakteri asam laktat juga banyak ditemukan pada bahan pangan yang lain diantaranya sayuran, buah-buahan serta produk daging. Peranan bakteri asam laktat pada bahan pangan ini ternyata lebih banyak yang menguntungkan dibanding yang merugikan. Bakteri asam laktat yang aktif dalam fermentasi makanan, akan memberikan daya simpan (keawetan) produk yang lebih lama dibandingkan dengan bahan dasarnya. Keawetan ini disebabkan oleh asam laktat, khususnya maupun asam-asam yang lain yang diproduksi oleh bakteri asam laktat selama fermentasi dapat menekan pertumbuhan bakteri pembusuk maupun patogen. Disamping asam yang dihasilkan ternyata sejumlah spesies bakteri asam laktat juga mampu menghasilkan berbagai komponen yang memiliki sifat antagonis terhadap bakteri lain, diantaranya bakteriosin, hidrogen peroksida, dan diasetil. Pada buku ini akan disajikan cara isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat yang terdapat pada berbagai bahan pangan, untuk lebih spesifiknya yaitu genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, dan *Lactococcus*. Pada paper ini penjelasan tentang cara-cara identifikasi serta kuncinya banyak diadopsi dari buku berbahasa Jepang tentang Bakteri Asam Laktat disusun oleh Kozaki, Uchimura dan Okada (Tokyo University of Agriculture), sedangkan untuk diskripsi masing-masing spesies bakteri asam laktat diambil dari buku *The Genera of Lactic Acid Bacteria* yang diedit oleh Wood dan Holzapel (1995).

Taksonomi bakteri asam laktat

Definisi yang tepat atau yang tanpa menimbulkan argumentasi untuk bakteri asam laktat adalah tidak ada. Definisi yang didasarkan pada karakteristik yang umum dengan batasan-batasan tertentu adalah hanya tepat untuk kelompok bakteri asam laktat tipikal. Sedang bakteri lain yang karakteristiknya mirip dengan bakteri asam laktat dikategorikan sebagai bakteri asam laktat atipikal. Pada umumnya bakteri asam laktat didefinisikan sebagai kelompok bakteri yang membentuk asam laktat, baik sebagai satu-satunya produk atau sebagai produk utama pada metabolisme karbohidrat. Bakteri asam laktat masuk ke dalam kelompok bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk bulat atau batang dan pada umumnya tidak memiliki katalase, meskipun kadang-kadang ditemukan pseudo-katalase pada kasus yang amat jarang terjadi. Bakteri ini merupakan kemoorganotropik dan tumbuh hanya pada media kompleks. Sebagai sumber energi utama adalah karbohidrat yang dapat difermentasi. Heksosa didegradasi terutama menjadi asam laktat (homofermentatif) atau asam laktat dan produk lain seperti asam asetat, etanol, CO₂, asam format, asam suksinat (heterofermentatif). Bakteri asam laktat banyak ditemukan pada makanan (produk hewani, daging yang difermentasi, adonan asam, fermentasi sayuran dan buah-buahan, silase, minuman), pada tanaman, saluran pembuangan, jalur genital, jalur intestin maupun respiratori pada manusia dan hewan.

Di bidang mikrobiologi pangan, taksonomi bakteri asam laktat yang didasarkan pada pendekatan penotipik konvensional sebagaimana adanya masih tetap berlaku. Secara umum dapat diterima bahwa genera yang termasuk di dalam bakteri asam laktat adalah *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Namun perlu juga diketahui bahwa didasarkan pada revisi terbaru, genera yang saat ini termasuk ke dalam bakteri asam laktat meliputi : *Aerococcus*, *Carnobacterium* (*Lactobacillus* atipikal), *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* atau *Pediococcus halophilus*, dan *Vagococcus* (Tabel 1). Walaupun telah lama diketahui bahwa beberapa bacilli juga memenuhi kriteria sebagai bakteri asam laktat, namun bakteri ini tidak pernah dikelompokkan ke dalam bakteri asam laktat. Pada mulanya genus *Bifidobacterium* juga dimasukkan ke dalam kelompok bakteri asam laktat, namun didasarkan pada kandungan mol % G+C pada DNA (bakteri asam laktat < 50 mol % G+C, *Bifidobacterium* > 50 mol %

G+C) dan data dari 16s rRNA, genus ini tidak lagi dimasukkan ke dalam kelompok bakteri asam laktat.

Pada umumnya klasifikasi bakteri asam laktat didasarkan pada morfologi (bulat, batang, membentuk tetrad), model fermentasi glukosa (homo atau heterofermentatif), pertumbuhan pada suhu berbeda, konfigurasi asam laktat yang dihasilkan (D,L,DL), kemampuan tumbuh pada konsentrasi garam tinggi, toleransi terhadap asam dan basa, dan tipe peptidoglikan pada dinding sel. Beberapa metoda saat ini sedang dikembangkan untuk identifikasi bakteri asam laktat, diantaranya hibridisasi DNA, pola protein terlarut, dan *ribotyping*.

Jalur fermentasi gula utama pada bakteri asam laktat yang selanjutnya digunakan untuk pengelompokan bakteri asam laktat adalah jalur glikolisis (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) dan jalur 6-fosfoglukonat atau fosfoketolase (Gambar 1.1). Didasarkan pada jalur ini Buchanan dan Gibson (1974) - dalam *Bergey's Manual* membagi bakteri asam laktat menjadi (1) homofermentatif yaitu spesies bakteri asam laktat yang merubah glukosa menjadi asam laktat dengan jumlah lebih besar dari 85 %; (2) heterofermentatif yaitu spesies yang menghasilkan campuran produk fermentasi dengan 50 % asam laktat dan produk lainnya yaitu etanol, asam asetat, gliserol, manitol, dan gas CO₂.

Genus *Lactobacillus*

Lactobacilli dicirikan dengan Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau bulat-batang (*coccobacilli*), kandungan G+C (DNA) < 50 mol %, *strictly fermentatif*, aerotoleran atau anaerob, asidurik atau asidofilik, membutuhkan nutrisi yang kompleks (karbohidrat, asam amino, peptida, ester asam lemak, garam-garam, derivat asam nukleat dan vitamin). Dengan glukosa sebagai sumber karbon, *Lactobacilli* dapat dikategorikan sebagai homofermentatif atau heterofermentatif. Dengan adanya oksigen atau oksidan yang lain jumlah asam asetat meningkat yang mungkin diproduksi dengan adanya asam laktat dan etanol, dengan penambahan 1 mol ATP melalui reaksi asetat kinase, sehingga sering terjadi variasi produk akhir. Berbagai komponen seperti sitrat, malat, tartrat, quinolat, nitrat, nitrit mungkin dimetabolisme dan digunakan sebagai sumber energi melalui pembentukan *proton motive force* atau aseptor elektron.

Lactobacilli ditemukan pada substrat yang kaya akan karbohidrat, dengan berbagai habitat, seperti membran mukosa manusia dan binatang (rongga mulut, intestin dan vagina), atau pada tanaman dan hasil tanaman, air buangan, makanan hasil fermentasi, dan makanan yang membusuk. Dari berbagai hasil penelitian diperoleh bahwa fermentasi makanan yang terdapat di Indonesia, Laos, ataupun Thailand banyak didominasi oleh *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacilli* dikelompokkan menjadi :

- (1) Grup A : *Lactobacilli* obligat homofermentatif. Heksosa hampir seluruhnya (>85 %) difermentasi menjadi asam laktat melalui jalur EMP. Bakteri ini memiliki fruktosa-1,6-bisfosfat aldolase tetapi tidak memiliki fosfoketolase, sehingga baik glukonat maupun pentosa tidak dapat difermentasi.
- (2) Grup B : *Lactobacilli* fakultatif heterofermentatif. Heksosa hampir seluruhnya difermentasi menjadi asam laktat melalui jalur EMP. Bakteri ini memiliki aldolase dan fosfoketolase, oleh karena itu tidak hanya heksosa yang difermentasi tetapi pentosa (kadang glukonat). Dengan adanya glukosa, ensim pada jalur fosfoglukonat terhambat. Fermentasi pentosa disajikan pada Gambar 1.3.
- (3) Grup C : *Lactobacilli* obligat heterofermentatif. Heksosa difermentasi melalui jalur fosfoglukonat menghasilkan asam laktat, etanol, asam asetat, dan gas CO₂. Pentosa yang masuk jalur ini dapat pula difermentasi.

Genus *Pediococcus*

Pediococci dicirikan dengan bentuk tetrad, asidofilik, homofermentatif, sel bulat dengan ukuran seragam (diameter 0.36-1.43 μ m), tidak pernah memanjang (berbeda dengan *Leuconostoc* yang kadang memanjang dan membentuk rantai). Bakteri ini nonmotil, tidak membentuk spora dan kapsula. Genus *Pediococcus* terdiri dari 8 spesies, dengan revisi bahwa *P.urinae-equii* jelas termasuk dalam genus *Aerococcus* dan *P.halophilus* harus dimasukkan ke genus baru *Tetragenococcus*. Genus

ini sangat heterogen, kecuali aktif pada proses pembuatan kecap bakteri iji juga dapat tumbuh pada bir.

Genus *Leuconostoc*

Ciri-ciri *Leuconostoc* adalah Gram positif, tidak membentuk spora, tidak motil, fakultatif anaerob, seluruh spesies membutuhkan media yang kaya dengan faktor tumbuh dan asam amino. Bentuk sel bervariasi tergantung dari kondisi pertumbuhannya. Pada medium glukosa, sel memanjang dan lebih menyerupai *Lactobacilli* daripada streptococci. Pada media susu, bakteri ini membentuk kokoid. Sel dapat berada sebagai sel tunggal, berpasangan atau membentuk rantai pendek. Spesies ini banyak ditemukan pada tanaman, produk hewani, daging dan berbagai makanan hasil fermentasi. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* memproduksi eksopolisakarida (dekstran) yang berlebihan pada silase dan merupakan kontaminan utama pada pabrik gula. Spesies *Leuconostoc* adalah heterofermentatif, dengan kondisi yang mikroaerofilik, glukosa akan dikonversi menjadi asam laktat, etanol dan gas CO₂ melalui kombinasi jalur heksosa monofosfat (6-fosfo glukonat) dan pentosa fosfat. Enzim kunci yang terdapat pada *Leuconostoc* adalah glukosa 6-fosfat dehidrogenase dan xilosa-5-fosfoketolase.

Genus *Streptococcus* dan *Lactococcus*

Genus *Streptococcus* adalah Gram positif, sel berbentuk bulat dan ovoid, dengan ciri rantai atau berpasangan, fakultatif anaerob, katalase negatif, homofermentatif, membutuhkan nutrisi yang kompleks. Sejumlah spesies diketahui bersifat parasit terhadap manusia atau hewan dan beberapa bersifat patogen. Didasarkan pada perbedaan serologi (Lancefield, 1933) streptococci digolongkan menjadi : Streptococci laktat - Streptococci Grup N, Streptococci patogen - Grup A, B, C, dan Enterococci - Grup D. Namun sejak 1993, antiserum grup N yang sebelumnya diproduksi oleh Institut Pasteur Paris tidak lagi dijual dipasaran. Schleifer dkk (1985) didasarkan pada hibridisasi asam nukleat, hubungan imunologi dari superoksida dismutase membagi streptococci menjadi : Genus *Streptococcus* - true Streptococci, Genus *Enterococcus* - Enterococci, dan Genus *Lactococcus* - genus baru. (N group)

Isolasi

Bakteri asam laktat banyak ditemukan pada bahan pangan dan memiliki sifat fisiologis yang sangat bervariasi. Dikarenakan sifatnya yang sangat bervariasi ini, tidak ada satupun jenis media yang dapat digunakan untuk isolasi dan menumbuhkan seluruh bakteri asam laktat yang ada. Sampai dengan saat ini satu-satunya media umum yang direkomendasikan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat adalah media MRS yang disusun oleh Man, Rogosa, dan Sharpe pada tahun 1960. Meskipun media MRS cocok untuk menumbuhkan bakteri asam laktat yang berasal dari oral, hasil hewani dan feses, media ini kadang-kadang tidak selalu berhasil apabila digunakan untuk isolasi bakteri asam laktat dari sayuran dan biji-bijian. Beberapa isolat bakteri asam laktat baru akan tumbuh baik saat MRS ditambah dengan ekstrak tomat sebagai sumber fruktosa. Beberapa isolat bakteri asam laktat memerlukan fruktosa sebagai sumber karbon utama, khususnya untuk isolat-isolat yang habitat alamnya dari lingkungan vegetatif yang banyak mengandung fruktosa. Beberapa *Leuconostoc* dan *Lactobacilli* yang berkaitan dengan minuman hasil fermentasi membutuhkan komponen ekstrak tomat dikarenakan terdapatnya senyawa asam 4'-o-(β-D-glukopiranosil)-D(R)-pantotenat sebagai faktor tumbuh. Sejumlah bakteri asam laktat juga sangat dipengaruhi oleh lingkungan alamiahnya, sehingga media isolasi yang akan digunakan harus disesuaikan dengan asal isolat, contohnya bakteri asam laktat yang diisolasi dari adonan roti atau dari bir membutuhkan maltosa sebagai sumber karbon.

Media yang lebih efektif yang dikembangkan untuk isolasi bakteri asam laktat adalah GYP (glukosa-ekstrak yeast-pepton) yang ditambah dengan 1 % CaCO₃. Penambahan kalsium karbonat ditujukan untuk seleksi bakteri asam laktat, bakteri yang tumbuh pada media ini akan memberikan zona jernih disekitar koloni setelah inkubasi 2-3 hari. Media isolasi bakteri asam laktat yang lain adalah GYP yang ditambah dengan 10 ppm sikloheksimid dan 10 ppm, sodium azida (NaN₃). Sikloheksimid ditujukan untuk menghambat sistem sintesa protein pada eukariot (yeast dan jamur), sedang sodium azida untuk menghambat rantai respiratori dari mikrobia aerob.

Metoda isolasi yang sering digunakan adalah dengan pengenceran sampel diikuti dengan *plating*. Namun untuk bakteri asam laktat yang jumlahnya tidak terlalu banyak pada sampel, populasinya dapat ditingkatkan terlebih dahulu dengan memasukkan sampel pada GYP cair yang telah diberi sikloheksimid dan sodium azida, setelah inkubasi selama 24 jam dilanjutkan dengan isolasi menggunakan metoda goresan atau pengenceran-*plating* pada GYP padat yang ditambah CaCO_3 . Isolat murni yang diperoleh dapat disimpan pada -80°C dalam gliserol 10 %, sedang stok isolat yang akan digunakan untuk uji lanjutan ditumbuhkan pada media tegak GYP yang ditambah CaCO_3 . Penyimpanan isolat dengan *deep freeze* (-80°C) dapat dilakukan dengan cara demikian, kultur bakteri asam laktat pada GYP cair umur 24 jam diambil 500 μl dan dimasukkan ke dalam 500 μl gliserol 20 % steril yang telah disiapkan dalam *cryotubes*.

Identifikasi

Identifikasi bakteri asam laktat dengan cara konvensional yang didasarkan pada karakteristik morfologi, uji biokimiawi, uji fisiologi, tipe fermentasi, dan tipe asam laktat masih tetap berlaku. Metoda kimia untuk determinasi karakteristik kimiawi sel bakteri asam laktat yang telah dikembangkan misalnya tipe peptidoglikan juga dapat digunakan untuk membantu proses identifikasi.

Pengecatan Gram dan morfologi

Pengecatan Gram, dilakukan pada kultur bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada GYP cair umur 24 jam. Uji morfologi yang meliputi bentuk dan ukuran sel dapat juga dilakukan bersamaan dengan pengecatan Gram.

Bentuk, ukuran, *cell arrangement*. Cara membuat preparat, isolat murni ditumbuhkan pada media cair GYP, diinkubasikan selama 24 jam. Dari kultur yang tumbuh diambil satu ose, kemudian dioleskan pada gelas penutup preparat, selanjutnya dikering-anginkan di atas api spiritus dengan jarak yang cukup jauh (40 cm), agar kultur tidak terbakar. Dijaga agar kultur yang terfiksasi setipis mungkin, dengan cara memiringkan gelas penutup supaya kultur mengalir ke bawah. Sel yang telah terfiksasi kemudian ditetesi dengan metilen biru. Cat selanjutnya dibersihkan dengan cara meneteskan secara tidak langsung bagian sel yang terfiksasi (air diteteskan di bagian belakang gelas penutup). Air yang melimpah pada gelas penutup dikeringkan dengan kertas tisu, selanjutnya gelas penutup diletakkan pada gelas preparat (bagian sel menyentuh gelas preparat). Untuk menjaga agar preparat tidak cepat kering, gelas penutup ini diolesi dengan cat kuku. Bentuk dan ukuran sel dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x.

Uji motilitas, dilakukan dengan inokulasi tusuk isolat bakteri asam laktat pada GYP agar lunak tegak (konsentrasi agar pada GYP diturunkan sampai 0,5 %). Isolat yang tidak motil hanya akan tumbuh disekitar tusukan inokulasi sedangkan isolat yang motil akan menyebar jauh.

Uji biokimiawi

Uji katalase, dilakukan dengan cara meneteskan larutan H_2O_2 pada kultur muda, reaksi positif terhadap uji katalase ditunjukkan dengan munculnya gelembung yang memberikan indikasi terbentuknya gas CO_2 .

Pembentukan dekstran dari sukrosa, dideteksi dengan menumbuhkan kultur pada agar sukrosa-yeast ekstrak-pepton (SYP). Inokulasi dilakukan dengan cara penusukan pada agar (disiapkan dalam cawan Petri). Produksi dekstran ditunjukkan dengan munculnya kenampakan berlendir disekitar koloni.

Pembentukan asam dari berbagai sumber karbon. Sumber karbon yang dipakai ada 21 atau 22 macam yaitu L-arabinosa, D-selobiosa, D-fruktosa, D-galaktosa, glukosa, glukonat, laktosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, D-melezitosa, rafinosa, L-rhamnosa, D-ribosa, salisin, D-sorbitol, pati, sukrosa, D-trehalosa, dan D-xilosa. Untuk beberapa spesies, uji terhadap gliserol juga penting digunakan untuk identifikasi. Untuk memudahkan pekerjaan, setiap kali pengujian dilakukan

terhadap 10 isolat. Untuk 10 isolat, diperlukan kira-kira 600 ml medium basal (YP / yeast ekstrak-pepton), dengan pH diatur 6,8. Untuk masing-masing sumber karbon ditimbang 25 gram dan ditambah 25 ml YP (konsentrasi masing-masing sumber karbon 1 %), selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing 2 ml. Untuk inokulasi digunakan kultur yang berumur 24 jam, dari kultur yang aktif ini diambil 500 μ l selanjutnya dimasukkan ke dalam 5 ml aquades steril. Pada ke-21 tabung yang masing-masing berisi satu jenis karbon dan 1 tabung tanpa sumber karbon diinokulasi dengan 1-2 drop kultur yang telah diencerkan 10x menggunakan drop pipet (pipet Pasteur). Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C, selama 1/3/5 hari, tergantung dari tumbuhnya kultur. Asam yang dihasilkan selanjutnya dititrasi dengan 0,1 N NaOH menggunakan campuran BTB dan NR yang dilarutkan dalam etanol, sebagai indikator. Titrasi dihentikan apabila warna telah berubah dari merah menjadi kehijau-hijauan (untuk isolat homofermentatif jumlah ml NaOH 0,1N yang diperlukan kira-kira 2 ml, sedang untuk heterofermentatif jumlah NaOHnya lebih rendah). Asam yang dihasilkan (mg/ml) dihitung dengan rumus sebagai berikut : $(9,0 \times \text{ml}(\text{titrasi}) \times F/2)$.

Uji fisiologis

Pengaruh suhu. Untuk melihat pengaruh suhu terhadap pertumbuhan, isolat bakteri asam laktat pada GYP diinkubasikan pada suhu 15, 25, 37, 45, 50 °C selama 1/3/5 hari tergantung kecepatan tumbuhnya. Untuk uji pertumbuhan dapat dilakukan dengan mengukur absorbansi kultur pada OD (700 nm) atau dengan cara kualitatif yaitu menggunakan kertas yang diberi garis-garis yang diletakkan dibelakang tabung reaksi tempat kultur tumbuh pada saat pengujian. Apabila tumbuh subur garis-garis tidak nampak dengan jelas, sedang apabila kultur tidak tumbuh garis akan nampak dengan jelas. Cara yang lainnya adalah dengan titrasi menggunakan 0.1 N NaOH seperti pada uji asam dari berbagai sumber karbon.

Pengaruh pH. Untuk melihat pengaruh pH awal media terhadap pertumbuhan, kultur ditumbuhkan pada GYP dengan berbagai variasi pH awal mulai dari 3,5 s/d 9,5 selama 1/3/5 hari tergantung dari jenis kultur. Uji terhadap pertumbuhan dilakukan seperti halnya pada uji pengaruh suhu.

Tipe fermentasi

Uji fermentasi digunakan untuk menggolongkan bakteri asam laktat ke dalam (1) kelompok homofermentatif yaitu apabila produk utama fermentasinya hanya berupa asam laktat, dan (2) kelompok heterofermentatif apabila produk fermentasinya tidak hanya asam laktat tetapi juga etanol, gas, maupun asam-asam yang lain. Oleh karena itu untuk menentukan tipe fermentasi dapat dilakukan dengan dua cara : (1) uji produksi gas, dan (2) uji etanol.

Uji produksi gas dilakukan dengan cara menumbuhkan kultur pada 5 ml GYP cair selama 2-3 hari dengan tabung Durham diletakkan secara terbalik untuk menangkap gas yang dihasilkan.

Uji etanol dilakukan dengan cara menumbuhkan kultur pada 5 ml GYP cair selama 2 hari, kemudian dihitung jumlah asam laktat yang terakumulasi pada kultur dengan titrasi menggunakan 0,1 N NaOH dan etanol dengan Ethanol-Kit (Cat no. 176 290 Boehringer Mannheim). Caranya, kultur disentrifugasi untuk memisahkan massa sel (massa sel yang terakumulasi di tabung bagian bawah dapat digunakan untuk uji tipe peptidoglikan). Supernatan yang jernih diambil, dan sejumlah 2 ml dititrasi menggunakan 0,1 N NaOH, dengan indikator BTB dan NR dalam larutan etanol. Untuk determinasi etanol, supernatan diencerkan 100 kalinya dengan aquades (100 μ l ditambah aquades sampai dengan 10 ml), selanjutnya diuji kandungan etanolnya berdasarkan prosedur yang tertera pada Kit. Jumlah etanol yang terakumulasi pada supernatan dihitung berdasarkan rumus pada petunjuk penggunaan Kit ini. Untuk selanjutnya dihitung perbandingan antara asam laktat serta etanol yang terdapat pada kultur, tipe fermentasi ditentukan dengan cara demikian :

$$\begin{aligned} 0,0 &\leq [E/L] < 0,05 : \text{homofermentatif} \\ 0,05 &\leq [E/L] < 0,30 : \text{diuji lagi} \\ 0,30 &\leq [E/L] < 0,51 : \text{heterofermentatif} \end{aligned}$$

Uji isomer asam laktat secara enzimatis

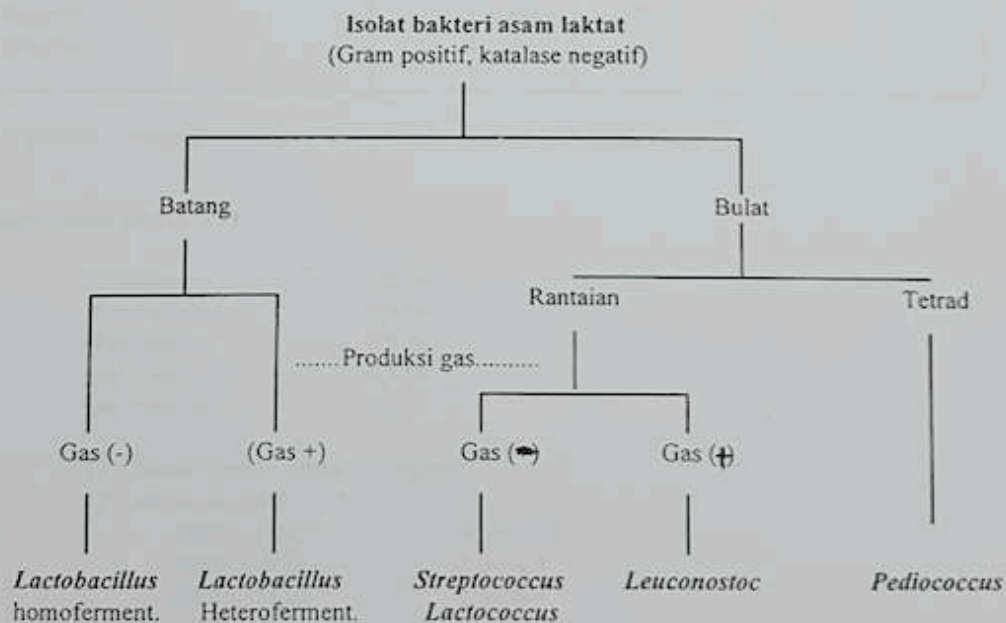
Uji isomer asam laktat (D/L) dilakukan menggunakan Kit (Cat. No. 1 112 821, Boehringer Mannheim) seperti halnya uji ethanol. Preparasi pengujian ini sama seperti halnya pada uji ethanol, sedang uji laktatnya berdasarkan prosedur yang tertera pada Kit, demikian pula cara menghitung masing-masing jenis asam laktat. Untuk menentukan tipe isomer asam laktat digunakan perhitungan sebagai berikut :

		D/L	
Tipe L	L	:	- 0,053
	L+DL	:	0,053 - 0,333
Tipe DL	DL+L	:	0,333 - 0,667
	DL	:	0,667 - 1,500
	DL+D	:	0,150 - 3,000
Tipe D	D+DL	:	3,000 - 19,00
	D	:	19,00 -

Tipe peptidoglikan

Untuk pengujian tipe peptidoglikan, 5 ml kultur disentrifugasi, massa sel yang diperoleh dicuci dengan aquades dan disentrifugasi kembali (aquades dibuang). Massa sel yang akan digunakan dapat juga diperoleh saat sentrifugasi pada uji tipe fermentasi dan isomer asam laktat. Massa sel yang diperoleh selanjutnya dihidrolisis dengan 100 μ l 6N HCl suhu 100 °C selama 1 jam, selanjutnya hidrolisat diaplikasikan pada TLC-cellulose (Merck no. 5716), sebagai molekul standar digunakan 2,6 diaminopimelic acid yang dilarutkan dalam aquades. Pengembangan TLC dilakukan menggunakan solven yang terdiri dari metanol:piridin:air:HCl (80:26:4:10) selama 2,5 jam. Visualisasi dilakukan dengan cara menyemprot TLC dengan 0,2 % ninhidrin (dilarutkan pada butanol), selanjutnya dipanaskan pada suhu 100 °C (oven) selama beberapa menit sampai muncul spot. Isolat yang memiliki tipe peptidoglikan DAP ditunjukkan dengan munculnya spot biru pada daerah yang sama dengan DAP standar.

Identifikasi awal untuk menentukan genera bakteri asam laktat



Tabel 1. Perbedaan karakteristik pada bakteri asam laktat

Karakteristik	<i>Carno bacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
Bentuk	Batang	Batang	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Tetrad	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Gas CO ₂ dari glukosa	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-
Pertumbuhan pada 10 °C	+	+/-	+	+	+	-	+/-	-	+
Pertumbuhan pada 45 °C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-
Pertumb. pada 6.5 % NaCl	ND	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-	+
Pertumb. pada 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Pertumbuhan pada pH 4,4	ND	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-
Pertumbuhan pada pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Tipe asam laktat	L	D,L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L
Relevansinya dengan Fermentasi makanan	-	++	-	-	++ (L) - (V)	+	+	+	+
Relevansinya dengan pembusukan makanan	+	++	-	+	-(L, V)	++	+	-	+
Relevansinya dengan penyakit	-	-	-	Unlikely	-(L, V)	-	-	+	-

+, positif; -, negatif, +/-, bervariasi diantara spesies, ND, tidak diuji

Komposisi media GYP :

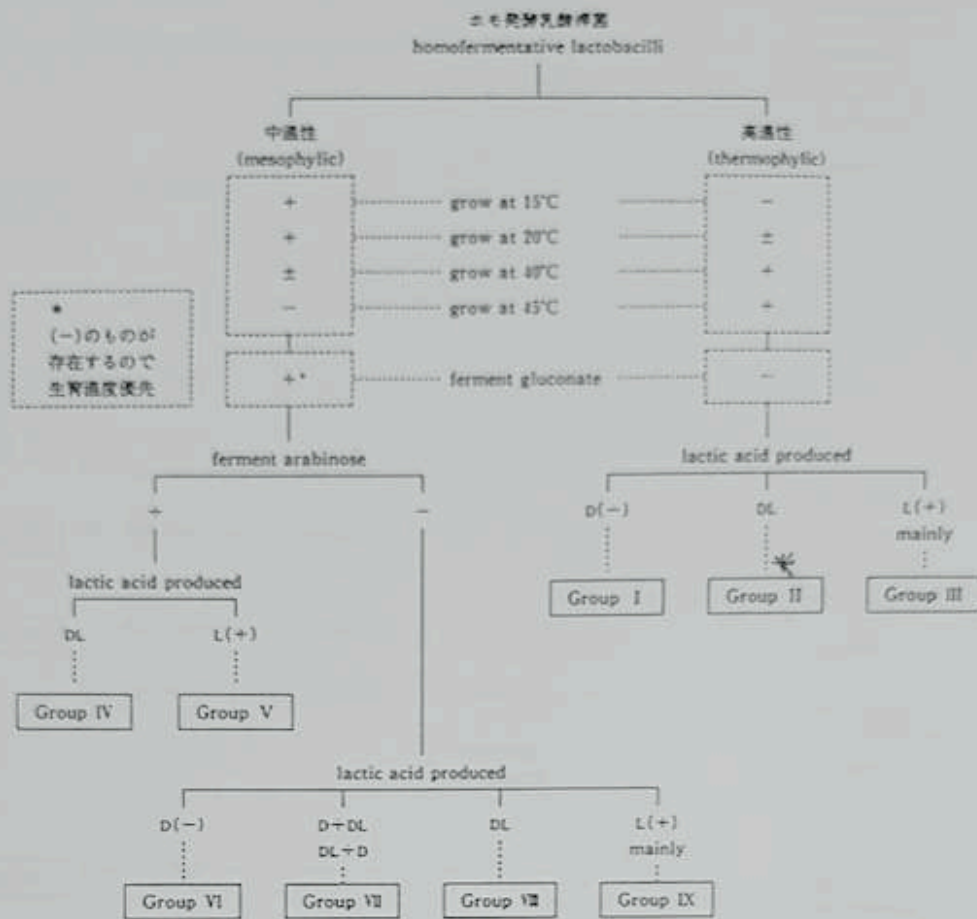
Glukosa	1,0 %
Yeast ekstrak	1,0 %
(Poli)pepton	0,5 %
Lar. Tween 80 ¹⁾	0,5 %
Lar. Mineral ²⁾	0,5 %

1) Larutan Tween setial 50 mg/ml

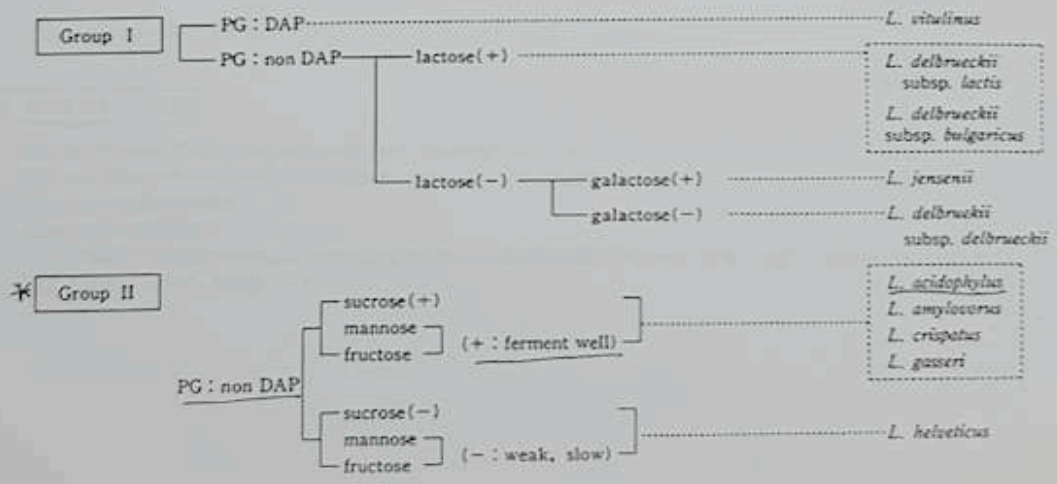
2) Larutan mineral

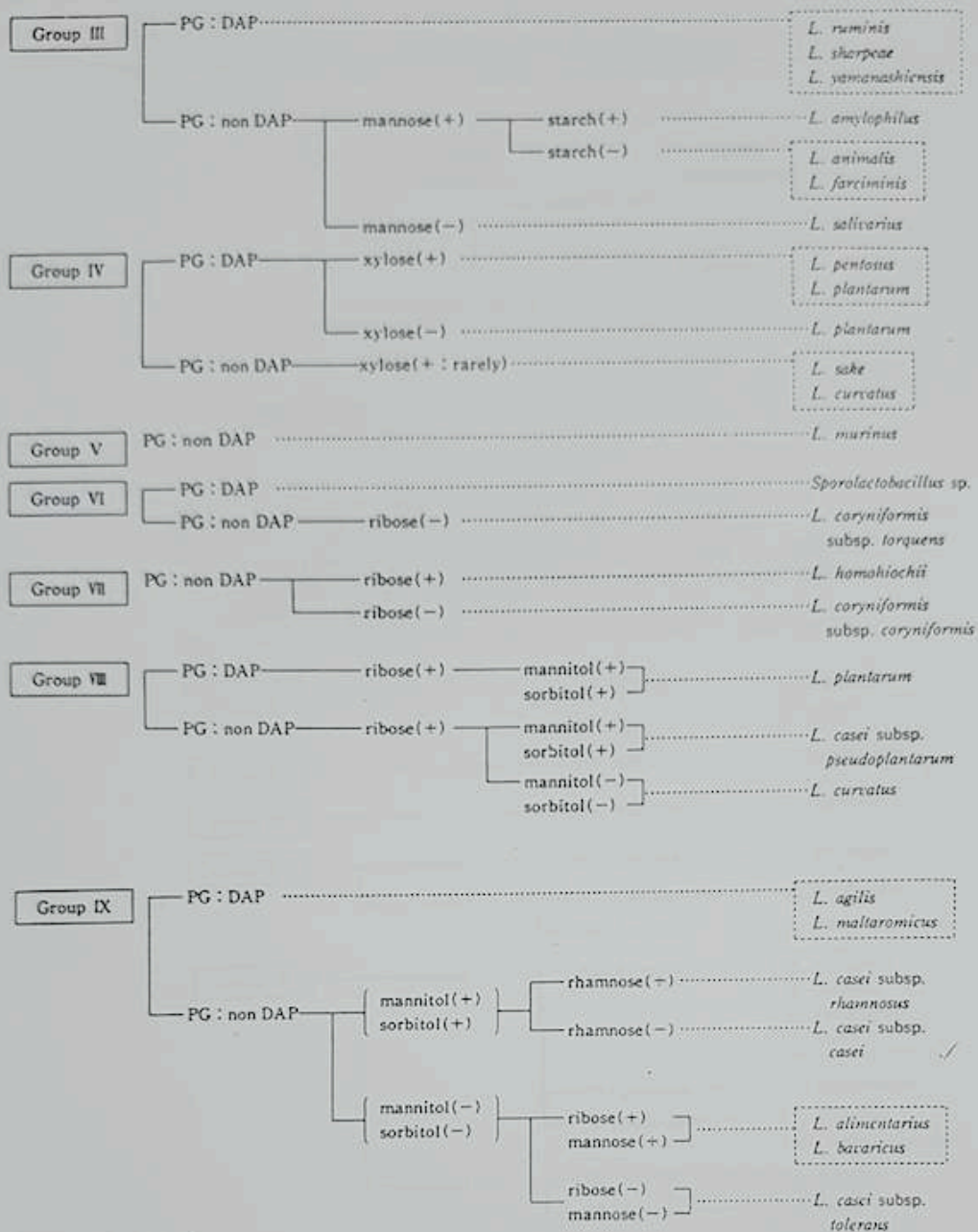
MgSO ₄ 7H ₂ O	40 mg/ml
MnSO ₄ 4H ₂ O	2 mg/ml
FeSO ₄ 7H ₂ O	2 mg/ml
NaCl	2 mg/ml
HCl pekat	1 drop

D-2 ダイアグラムーホモ発酵乳酸桿菌



* (-)のものが存在するので生育温度優先

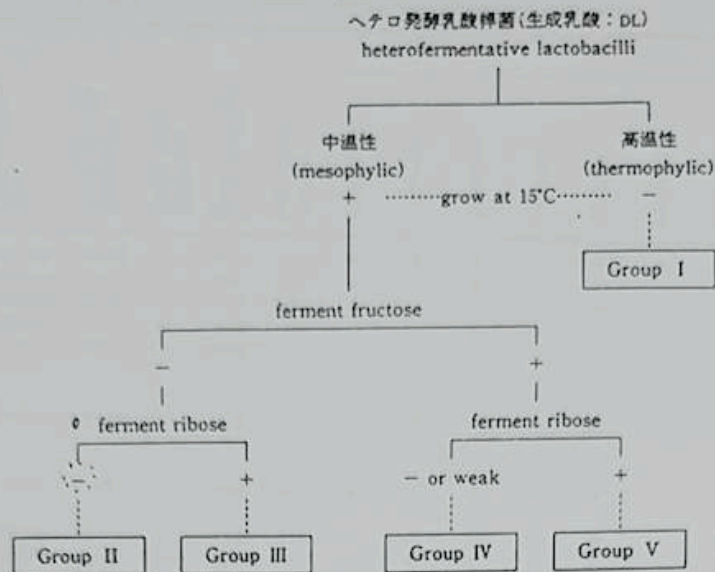




ダイアグラムの見方

- PG : DAP = *meso* DAP (diaminopimelic acid) peptidoglycan type
- PG : non DAP = 非 *meso* DAP peptidoglycan type (ここでは Lys 型や Orn 型を指す)
- sugar (+) = 糖の発酵性あり
- sugar (-) = 糖の発酵性なし
- [] で囲われた複数の菌種名は、一般的な生理試験からは区別が困難であるもの、決着には高度の同定手段 (GC %, DNA-DNA ホモロジーなど) を必要とする。

D-3 ダイアグラムーヘテロ発酵乳酸桿菌



注1: ヘテロ発酵乳酸桿菌は、生成乳酸の光学異性はDL(ラセミ)である。もしも同定株がD(-)乳酸ならば、*Leuconostoc* 属の可能性を疑う必要がある。この場合、細胞形が長く球菌とは判定されないことが多い。

注2: まれにL(+)-乳酸を産生するヘテロ発酵乳酸桿菌もみつかるので、見逃さないこと。

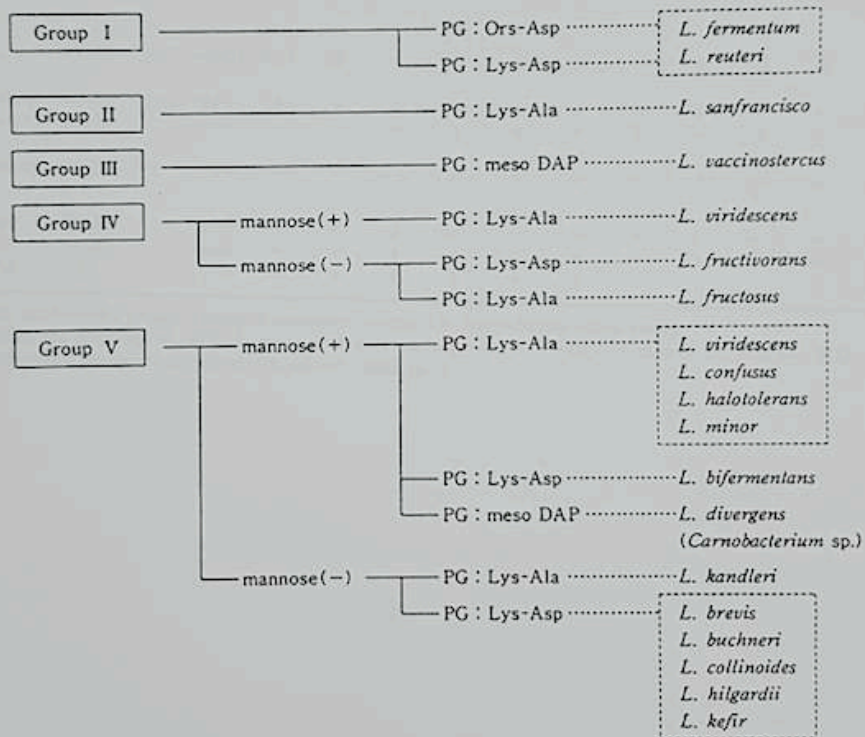


Table 3.2. Phylogenetic grouping and key characteristics of Group A lactobacilli (obligately homofermentative)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer(s)	Growth (°C) 15/45	NH ₃ from arginine	Carbohydrates fermented†											
							Amygdalin	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose
1 <i>Lb. acidophilus</i>	a	Lys-DAsp	34-37	III	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	d	d	+	+	d
2 <i>Lb. amylophilus</i>	a	Lys-DAsp	44-46	I	+/-	ND	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
3 <i>Lb. amylovorus</i>	a	Lys-DAsp	40-41	III	-/+	ND	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
4 <i>Lb. crispatus</i>	a	Lys-DAsp	35-38	III	-/+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5a <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	a	Lys-DAsp	49-51	II	-/+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5b <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	a	Lys-DAsp	49-51	II	-/+	d	-	d	-	-	d	-	+	-	-	-	+	d
5c <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	a	Lys-DAsp	49-51	II	-/+	d	+	d	d	+	+	-	+	-	-	+	+	+
6 <i>Lb. gallinarum</i>	a	Lys-DAsp	36-37	III	+/+	ND	+	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	-
7 <i>Lb. gasserii</i>	a	Lys-DAsp	33-35	III	-/+	-	+	+	+	d	d	-	+	d	d	+	+	d
8 <i>Lb. helveticus</i>	a	Lys-DAsp	38-40	III	-/+	-	-	-	+	+	d	-	d	-	-	-	-	d
9 <i>Lb. jensenii</i>	a	Lys-DAsp	35-37	II	-/+	+	+	+	+	-	d	+	+	+	-	+	+	+
10 <i>Lb. johnsonii</i>	a	Lys-DAsp	33-35	III	+/+	ND	+	+	+	d	+	-	+	d	d	+	+	d
11 <i>Lb. kefirano-faciens</i>	a	ND	34-35	II(I)	-/-	ND	-	-	+	+	+	-	ND	+	+	-	+	-
12a <i>Lb. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i>	b	Lys-DAsp	39-43	I(II)	-/ND	ND	d	d	-	-	+	-	+	-	-	d	+	+
12b <i>Lb. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>	b	Lys-DAsp	39-43	III	-/ND	ND	d	+	d	d	+	-	+	d	+	+	+	+
13 <i>Lb. farciminis</i>	b	Lys-DAsp	34-36	I(II)	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
14a <i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	b	Lys-DAsp	34-36	I	-/+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14b <i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	b	Lys-DAsp	34-36	I	-/+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
15 <i>Lb. mali</i>	b	DAP	32-34	I	+/-	-	+	d	d	-	-	-	+	-	-	+	+	+
16 <i>Lb. ruminis</i>	b	DAP	44-47	I	-/d	-	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	-
17 <i>Lb. sharpae</i>	b	DAP	53	I	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

*Group a species belong to the *Lb. delbrueckii* group; Group b organisms to the *Lb. casei*-*Pediococcus* group.

†Symbols: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available; DAP, diaminopimelic acid. Parenthesized isomers indicate <15% of total lactic acid.

Table 3.3 Phylogenetic grouping and key characteristics of Group II lactobacilli (facultatively heterofermentative)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol%)	Lactic acid isomer(s)	Growth (°C) 15/45	Carbohydrates fermented†																	
						Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose					
18 <i>Lb. acetotolerans</i>	a	Lys-DAsp	35-36.5	DL	-/-	-	-	d	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19 <i>Lb. hamsteri</i>	a	Lys-DAsp	33-35	DL	-/ND	ND	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20 <i>Lb. alimentarius</i>	b	Lys-DAsp	36-37	l(n)	+/-	ND	d	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	
21 <i>Lb. bifementans</i>	b	Lys-DAsp	45	DL	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 <i>Lb. casei</i>	b	Lys-DAsp	45-47	l	+/-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23a <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	b	Lys-DAsp	45	DL	+/-	-	-	-	d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23b <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	b	Lys-DAsp	45	DL	+/-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
24 <i>Lb. curvatus</i>	b	Lys-DAsp	42-44	DL	+/-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
25 <i>Lb. graminis</i>	b	Lys-DAsp	41-43	DL	+/-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 <i>Lb. homohiochii</i>	b	Lys-DAsp	35-38	DL	+/-	-	-	d	ND	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
27 <i>Lb. intestinalis</i>	b	Lys-DAsp	33-35	DL	-/+	-	-	d	-	ND	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
28 <i>Lb. murinus</i>	b	Lys-DAsp	43-44	l	-/+	d	+	+	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
29a <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	b	Lys-DAsp	45-47	l/nt†	+/d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-
29b <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	b	Lys-DAsp	45-47	l	+/-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 <i>Lb. rhamnosus</i>	b	Lys-DAsp	45-47	l	+/+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
31 <i>Lb. sake</i>	b	Lys-DAsp	42-44	DL	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
32 <i>Lb. agilis</i>	b	DAP	43-44	l	-/+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	-
33 <i>Lb. pentosus</i>	b	DAP	46-47	DL	+/-	+	+	+	ND	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34 <i>Lb. plantarum</i>	b	DAP	44-46	DL	+/-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d

*Group a species belong to the *Lb. delbrueckii* group; Group b organisms to the *Lb. casei-Pediococcus* group.

†For symbols, see Table 3.2; w, weak positive reaction

‡Strains formerly designated *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum* produce DL-lactic acid.

Table 3.4 Phylogenetic grouping and key characteristics of Group C lactobacilli (obligately heterofermentative)*

Species†	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol%)	Growth (°C) 15/45	NH ₃ from arginine	Arabinose	Carbohydrates fermented‡											
							Cellobiose	Esculin	Galactose	Maltose	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Trehalose	Xylose
35 <i>Lb. brevis</i>	b	Lys-DAsp	44-47	+/-	+	+	-	d	d	+	-	-	+	d	+	d	-	d
36 <i>Lb. buchneri</i>	b	Lys-DAsp	44-46	+/-	+	+	-	d	d	+	+	+	+	d	+	d	-	d
37 <i>Lb. collinoides</i> §	b	Lys-DAsp	46	+/-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
38 <i>Lb. fermentum</i>	b	Orn-DAsp	52-54	-/+	+	d	d	-	+	+	w	-	+	+	+	+	d	d
39 <i>Lb. fructivorans</i>	b	Lys-DAsp	38-41	+/-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	w	d	d	-
40 <i>Lb. hilgardii</i>	b	Lys-DAsp	39-41	+/-	+	-	-	-	-	d	+	-	d	-	+	d	-	+
41 <i>Lb. kefir</i>	b	Lys-DAsp	41-42	+/-	+	d	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
42 <i>Lb. malefermentans</i> §	b	Lys-DAsp	41-42	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
43 <i>Lb. oris</i>	b	Lys-DAsp	49-51	-/d	-	+	d	d	+	+	d	-	+	+	+	+	d	+
44 <i>Lb. parabuchneri</i>	b	Lys-DAsp	44	+/ND	+	+	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	-
45 <i>Lb. reuteri</i>	b	Lys-DAsp	40-42	-/+	+	+	-	ND	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
46 <i>Lb. pontis</i>	b	Orn-DAsp	53-55	+/+	+	-	-	-	d	+	-	-	d	d	+	+	+	-
47 <i>Lb. vaginalis</i>	b	Orn-DAsp	38-41	-/+	ND	-	-	d	+	+	+	-	+	+	d	+	-	-
48 <i>Lb. zuehlicus</i>	b	DAP	40	+/d	ND	+	d	-	+	+	ND	-	d	-	+	d	-	+
49 <i>Lb. vaccinosericus</i>	b	DAP	36	-/-	-	+	w	-	w	+	-	-	-	-	+	-	-	+
50 <i>Lb. sanfrancisco</i>	b	Lys-Ala	36-38	+/-	-	-	-	ND	d	+	-	-	-	-	d	d	-	-
51 <i>Lb. confusus</i>	c	Lys-Ala	45-47	+/+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
52 <i>Lb. fructosus</i>	c	Lys-Ala	47	+/-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53 <i>Lb. halotolerans</i>	c	Lys-Ala-Ser	45	+/-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
54 <i>Lb. viridescens</i>	c	Lys-Ala-Ser	41-44	+/-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	d	d	-
55 <i>Lb. kandleri</i>	c	Lys-Ala-Gly-Ala ₂	39	+/-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
56 <i>Lb. minor</i>	c	Lys-Ser-Ala ₂	44	+/-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-

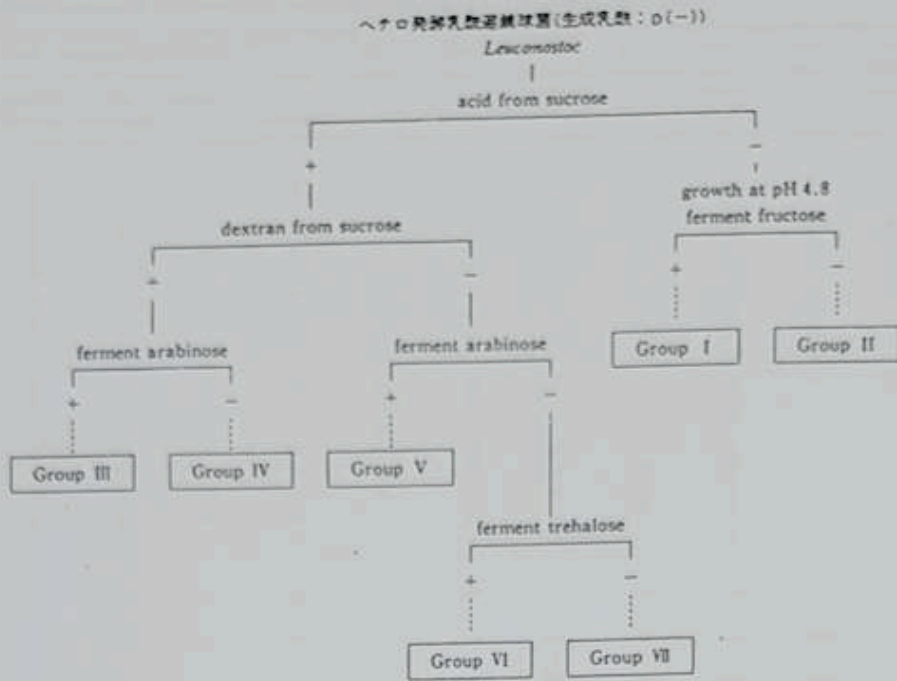
*The following sugars are generally fermented: fructose (exceptions: *Lb. malefermentans*, *Lb. sanfrancisco*, (some strains) and *Lb. vaccinosericus*) and glucose. The following sugars are generally not fermented: amygdalin (exceptions: *Lb. confusus* and *Lb. oris*), mannitol (exception: *Lb. kandleri*), rhamnose and sorbitol.

†*Group b species belong to the *Lb. casei*-*Pediococcus* group; Group c organisms to the *Leuconostoc* group.

‡For symbols, see Tables 3.2 and 3.3.

§Phylogenetic grouping due to peptidoglycan type.

D-4 ダイアグラム—*Leuconostoc*



Leuconostoc 属菌種の共通の特徴

ヘテロ発酵をする連鎖球菌で、生成乳酸の光学異性は全菌種においてD(-)型である。

注1: 本属に該当する菌株の中に、球よりやや長い楕球や非常に長い細胞をもつものがある(例: *Leuconostoc lactis*)。

注2: 生成乳酸の光学異性に違いがあったなら、次のように再検討する。

- ・DL型であったなら、細胞形を再検討し、*Lactobacillus* 属の可能性を考える。また四聯球菌の *Pediococcus* 属の可能性もある。この場合は、細胞配列の再検討とともに、発酵形式も調べ直す。
- ・L(+)型であったなら、*Streptococcus* 属の可能性もある。発酵形式を調べ直す。

Group I	<i>Leuc. oenos</i>
Group II	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Group III	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Group IV	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
Group V	<i>Leuc. paramesenteroides</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Group VI	<i>Leuc. paramesenteroides</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Group VII	<i>Leuc. lactis</i>

ダイアグラムの見方

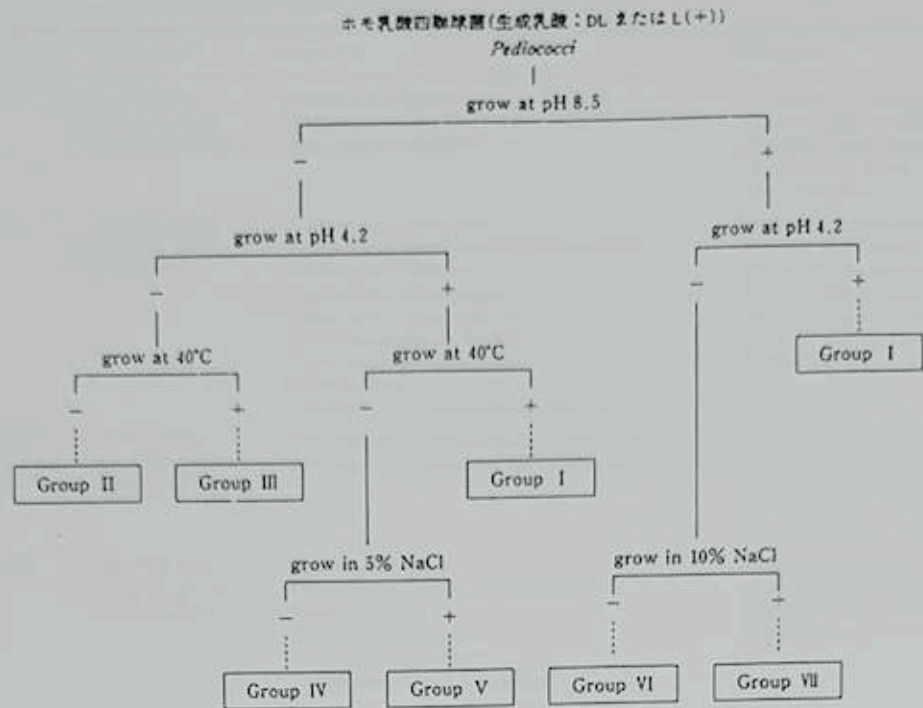
[.....] で囲われた複数の菌種名は、一般的な生理試験からは区別が困難であるもの、決着には高度の同定手段(DNA-DNAホモロジーなど)を必要とする。

Table 7.1 Diagnostic characteristics of the subspecies and species belonging to the genus *Leuconostoc**

Characteristics	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp.			<i>Leuc. paramesenteroides</i>	<i>Leuc. lactis</i>	<i>Leuc. oenos</i>	<i>Leuc. gelidium</i>	<i>Leuc. carnosum</i>	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	<i>Leuc. citreum</i>	<i>Leuc. amelibiosum</i>	<i>Leuc. argentinum</i>	<i>Leuc. fallax</i>
	<i>mesenteroides</i>	<i>deltronicum</i>	<i>cremoris</i>										
Acid from													
Arabinose	+	-	-	d	-	d	+	-	d	+	+	d	-
Arbutin	d	-	-	-	-	ND	+	-	d	+	ND	-	-
Cellulose	d	d	-	(d)	-	d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cellobiose	d	-	-	d	-	d	+	d	d	d	+	d	+
Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	d	+	+	+	d	-	-	d	-	ND	+	-
Lactose	d	+	d	d	+	-	-	-	d	-	-	+	-
Maltose	+	+	-	+	+	-	d	-	+	+	+	+	+
Mannitol	d	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d	(d)
Mannose	d	d	-	+	d	d	+	d	+	+	ND	+	+
Melibiose	d	d	-	+	d	d	+	d	d	-	-	+	-
Raffinose	d	d	-	d	d	-	+	-	d	-	-	+	-
Ribose	d	ND	-	+	-	d	d	d	+	-	-	-	+
Salicin	d	-	-	-	d	d	+	d	d	+	+	-	-
Sucrose	+	+	-	+	+	-	+	+	d	+	+	+	+
Trehalose	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	d	(d)
Xylose	d	d	-	-	-	d	+	-	+	-	-	d	-
Hydrolysis of esculin	+	d	-	d	-	+	+	d	d	+	ND	-	ND
Dextran formation	+	+	-	-	-	-	+	+	ND	ND	+	-	ND
Growth at pH 4.8	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
Requirement for TJI ²	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 10% ethanol	-	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NAD-dependent G6P ³ DH present	+	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Growth at 37°C	d	+	-	d	+	d	-	-	+	d	ND	+	+
Peptidoglycan type	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ser-Ala ₂	Lys-Ala ₂	Lys-Ala ₂	Lys-Ser ₂ -Lys-Ala-Ser	ND	ND	Lys-Ser-Ala ₂	d ND	Lys-Ala ₂	+	+

*+, 90% or more of the strains positive; -, 90% or more of the strains negative; d, 11-98% of the strains positive; (d), delayed reaction; ND, no data. Data for *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. paramesenteroides*, *Leuc. lactis* and *Leuc. oenos* are from Garvie (1986). Data for *Leuc. gelidium* and *Leuc. carnosum* are from Shaw and Harding (1989), *Leuc. pseudomesenteroides* and *Leuc. citreum* from Farrow et al. (1989), *Leuc. amelibiosum* from Schillinger et al. (1989), *Leuc. argentinum* from Dicks et al. (1993), and *Leuc. fallax* from Martinez-Murcia and Collins (1991).

D-5 ダイアグラム—*Pediococci*



- Group I — 50°C(+) *Ped. acidilactici* (生成乳酸: DL)
- Group I — 50°C(-) *Ped. pentosaceus* (生成乳酸: DL)
- Group II *Ped. inopinatus* (生成乳酸: DL)
- Group III *Ped. dextrinicus* (生成乳酸: L(+))
- Group IV *Ped. damnosus* (生成乳酸: DL)
- Group V *Ped. parvulus* (生成乳酸: DL)
- Group VI *Ped. urinaeequi* (生成乳酸: L(+))
- Group VII *Ped. halophilus* (生成乳酸: L+DL)

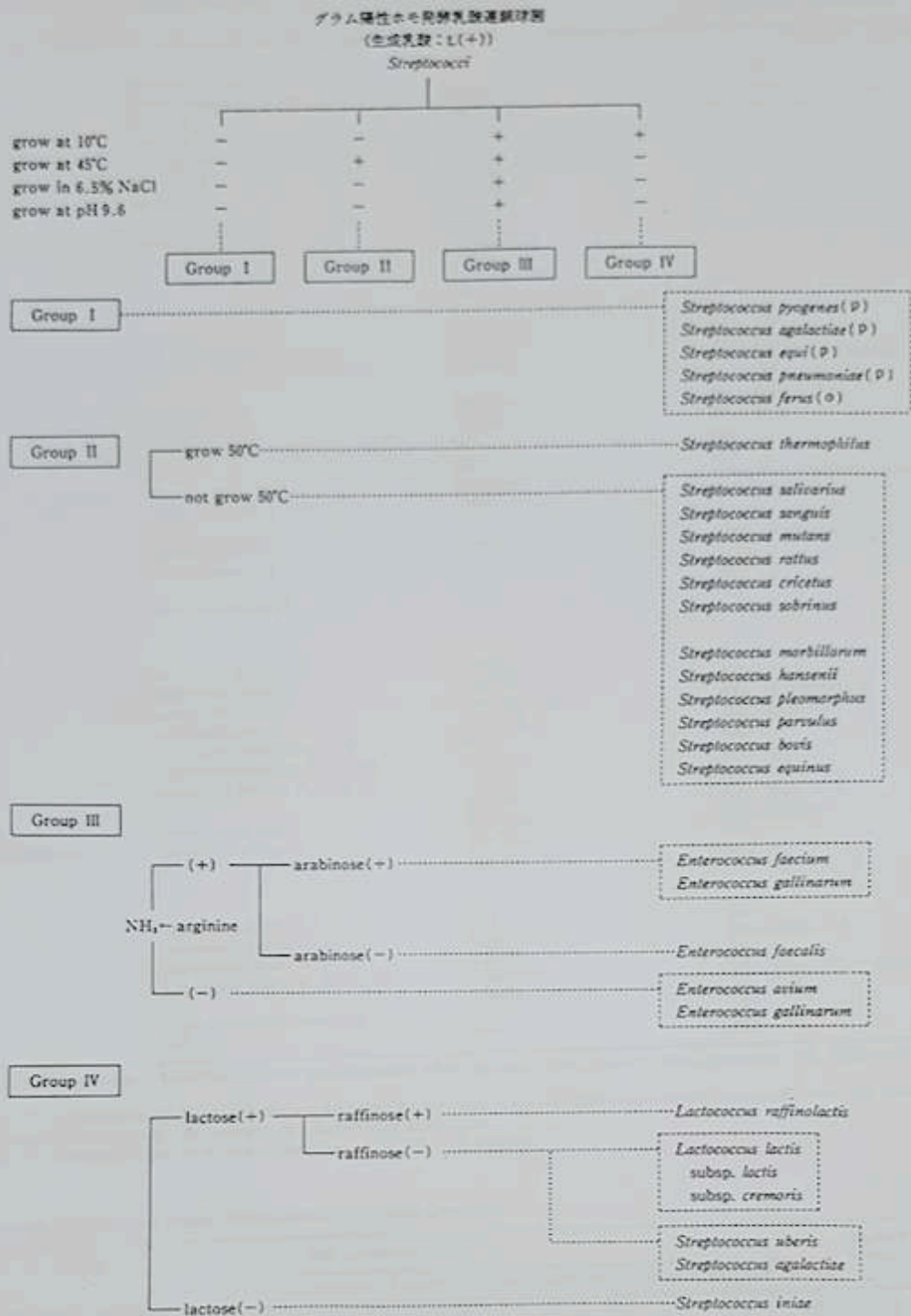
Table 5.1 Names, synonyms and descriptions of *Pediococcus* species

Species and priority	Type strain*	Synonyms	Description
<i>Pediococcus acidilactici</i> (Lindner, 1887)	DSM 20284 (proposed by Garvie (1986b))	' <i>Pediococcus lindneri</i> ' ' <i>Pediococcus cerevisiae</i> ' ' <i>Streptococcus lindneri</i> '	Grow at 50°C. Ferment ribose, arabinose and/or xylose. Unable to utilize maltose; <i>m</i> -lactate produced from glucose. Hydrolyse arginine. Mol% G+C 38-44. Associated mainly with plant materials.
<i>Pediococcus damnosus</i> (Clausen, 1903)	NCDO 1832† (ATCC 29358; DSM 20331)	' <i>Pediococcus cerevisiae</i> ' ' <i>Pediococcus cerevisiae</i> subsp. <i>mevalovorius</i> ' ' <i>Pediococcus viscosus</i> ' ' <i>Pediococcus perniciosus</i> ' ' <i>Pediococcus sarcinaeformis</i> ' ' <i>Pediococcus odoris mellisimilis</i> ' ' <i>Pediococcus mevalovorius</i> ' ' <i>Streptococcus damnosus</i> ' ' <i>Streptococcus damnosus</i> var. <i>limosus</i> '	Unable to ferment ribose or hydrolyse arginine. No acid from starch, no acid or gas from gluconate, no growth at pH 8.0 or at 35°C. Most strains hop-tolerant and able to grow in beer; <i>m</i> -lactate produced from glucose. Mol% G+C 37-42. Associated mainly with beer and breweries.
<i>Pediococcus dextrinicus</i> (Coster and White, 1964; Back, 1978b)	DSM 20335 (NCDO 1561; ATCC 33087)	' <i>Pediococcus cerevisiae</i> subsp. <i>dextrinicus</i> ' ' <i>Streptococcus damnosus</i> var. <i>diastaticus</i> '	Unable to ferment ribose or hydrolyse arginine. Acid from starch, acid and gas from gluconate, growth at pH 8.0, <i>l</i> (+)-Lactate produced from glucose. Mol% G+C 40-41. Associated with fermenting plant materials.
<i>Pediococcus halophilus</i> (Mees, 1934)	NCDO 1635 (ATCC 33315; DSM 20339)	' <i>Pediococcus soyae</i> ' ' <i>Pediococcus acidilactici</i> var. <i>soyae</i> ' ' <i>Tetracoccus</i> no. 1' ' <i>Tetracoccus halophilus</i> ' ' <i>Sarcina hamaguchiae</i> ' ' <i>Tetratogenococcus halophilus</i> '	Grow in presence of 15% NaCl and at pH 9.0. <i>l</i> (+)-Lactate produced from glucose. Mol% G+C 34-36.5. Associated with salty environments.
<i>Pediococcus inopinatus</i> (Back, 1978a)	DSM 20285	' <i>Pediococcus cerevisiae</i> '	Unable to ferment pentoses and lactose. Does not hydrolyse arginine. <i>m</i> -Lactate produced from glucose. Mol% G+C 39-40. Associated with beer and alcoholic beverages.
<i>Pediococcus parvulus</i> (Günther and White, 1961a)	NCDO 1634 (ATCC 19371; DSM 20332)	None	Grows at pH 4.5. Unable to utilize pentoses, lactose or starch. Does not hydrolyse arginine. Forms <i>m</i> -lactate from glucose. Mol% G+C 40.5-41.6. Associated with fermented plant materials, cider and wine.
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (Mees, 1934)	NCDO 990 (ATCC 33161; DSM 20336)	' <i>Pediococcus hennebergi</i> ' ' <i>Pediococcus citrovorum</i> ' ' <i>Pediococcus cerevisiae</i> ' ' <i>Pediococcus acidilacti</i> ' ' <i>Streptococcus acidi-lactici</i> '	Ferment pentoses (except strains belonging to <i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>intermedius</i>). Ferment maltose. Do not ferment starch or melizitose. Hydrolyse arginine. Maximum temperatures for growth 39-45°C. <i>m</i> -Lactate produced from glucose. Mol% G+C 35-39. Associated with plant materials.
<i>Pediococcus urinae-equi</i> (ex Mees) nom. rev.	NCDO 1636 (ATCC 29723; DSM 20341)	' <i>Pediococcus cerevisiae</i> var. <i>urinae-equi</i> ' ' <i>Pediococcus urinae-equi</i> ' ' <i>Aerococcus viridans</i> '	Grow at pH 9.0. Produces <i>l</i> (+)-lactate from glucose. Grow in the absence of fermentable carbohydrate. Mol% G+C 39.6-39.7. Associated with horse urine and animal faeces.

*DSM; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Munich, Germany. NCDO; National Collection of Dairy Organisms, Reading, UK. ATCC; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

†Type strain of the genus.

D-6 ダイアグラム—*Streptococci*



Streptococcus 属の共通の特徴

直連鎖球菌で、ホモ発酵をし、L(+)乳酸を生成する。

注: *Streptococci* に該当する中には、化膿や肺炎などの病原性を示すものが存在し、正確な同定のためには、溶血性や血清タイプを調べる必要がある。上記で示した同定項目だけでは、同定結果が不正確である場合がある。このように、本図群の中には病原性を示すものが含まれるので、種 (species) の判定には慎重を期す必要がある。上記ダイアグラムで種 (species) の目安をつけ、Bergey's manual や医学の分類学などを参考に詳細な同定をすることをすすめる。

Table 4.1 Serological markers and cell compositions of streptococci (species names are arranged in currently recognized species groups)

Species groups	Serological markers	Murein type	Characteristic cell wall polysaccharide components*
Oral streptococci			
<i>S. mutans</i>	Serotype c, e or f	Lys-Ala _{2,3}	Rha, Gluc
<i>S. sobrinus</i>	Serotype d, or h, g (or -)	Lys-Thr-Ala	Rha, Gluc, Gal
<i>S. cricetus</i>	Serotype a	Lys-Thr-Ala	Rha, Gluc, Gal
<i>S. rattus</i>	Serotype b	Lys-Ala _{2,3}	Rha, Gal, Glyc
<i>S. macoccae</i>	Serotype c	ND	ND
<i>S. downei</i>	Serotype h	Lys-Thr-Ala	ND
<i>S. ferus</i>	Serotype c	Lys-Ala _{2,3}	ND
* <i>S. salivarius</i>	Lancefield K, -	Lys-Ala _{2,3} Lys-Thr-Ala	Rha, Gluc, Gal, GalNAc
<i>S. vestibularis</i>	-	-	-
† <i>S. thermophilus</i>	-	Lys-Ala _{2,3}	ND
<i>S. intermedius</i>	-	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc
<i>S. constellatus</i>	- or Lancefield F, † A or C	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc, Gal,
<i>S. anginosus</i>	- or Lancefield F, † A, C, or G	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc, Gal, GalNAc
<i>S. tonguis</i>	Lancefield H, † -	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc,
<i>S. gordonii</i>	Lancefield H, † -	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Glyc
<i>S. parasanguis</i>	- (or Lancefield F, G, C or B)	ND	ND
<i>S. crista</i>	ND	ND	ND
<i>S. oralis</i>	-	Lys-direct	Gluc, Gal, GalNAc, (Rha), Rtl
<i>S. mitis</i>	- (Lancefield K or O)	Lys-direct	(Rha), Rtl
<i>S. pneumoniae</i>	C-polysaccharide capsular antigens	Lys-Ala ₂ (Ser)	Gluc, (Gal), GalNAc, (Rha), Rtl
<i>S. adjectans</i>	-	ND	ND
<i>S. defectivus</i>	- (or Lancefield H)	ND	ND
Pyogenic streptococci			
<i>S. pyogenes</i>	Lancefield group A§	Lys-Ala _{1,3}	Rha
<i>S. canis</i>	Lancefield group G	Lys-Thr-Gly	ND
<i>S. agalactiae</i>	Lancefield group B	Lys-Ala _{1,3} (Ser)	Rha, Gal, Glucitol
<i>S. dysgalactiae</i>	Lancefield group C, G, L	Lys-Ala _{1,3}	Rha, GalNAc
<i>S. parauberis</i>	- or Lancefield group E, P	ND	ND
<i>S. uberis</i>	- (Lancefield group E, P, G)	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc
<i>S. porcinus</i>	Lancefield groups F, P, U, V	Lys-Ala _{2,4}	ND
<i>S. infantis</i>	-	Lys-Ala _{1,3}	Rha, Gluc, Gal,
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	Lancefield group C	Lys-Ala _{1,3}	Rha, GalNAc
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	Lancefield group C	Lys-Ala _{2,3}	ND
<i>S. hyointestinalis</i>	-	Lys-Ala (Ser)	ND
Other streptococci			
<i>S. alactolyticus</i>	Lancefield group D	ND	ND
<i>S. bovis</i>	Lancefield group D	Lys-Thr-Ala	Rha, Gluc, Gal
<i>S. equinus</i>	Lancefield group D	Lys-Thr-Ala	ND
<i>S. suis</i>	Lancefield group R, S, RS, T	Lys-direct	Rha, Gluc, (Gal), (GalNAc)
<i>S. acidominimus</i>	-	Lys-Ser-Gly	Rha, Gal
<i>S. intestinalis</i>	- (or Lancefield group G)	ND	ND
<i>S. caprinus</i>	ND	ND	ND

*ND, not determined; Gal, galactose; GalNAc, N-acetyl galactosamine; Gluc, glucose; Glyc, glycerol; Rha, rhamnose; Rtl, ribitol; and (), trace amounts.

†Further subdivision of Lancefield Group F strains has been described on the basis of type-specific carbohydrate antigens (Ottens and Winkler, 1962).

‡Reactions with Group H antiserum vary according to the immunizing strain used.

§Further subdivision of Lancefield Group A strains on the basis of M, T and R antigens.

Table 6.14 Characteristics differentiating species and subspecies of the genus *Lactococcus**

Species	Source	Acid production from						Hydrolysis of arginine
		Galactose	Lactose	Maltose	Melibiose	Melzitose	Raffinose	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Raw milk and dairy products	+	+	+	-	-	-	+
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Raw milk and dairy products	+	+	-	-	-	-	-
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	Leaf hopper	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lc. garviae</i>	Bovine samples	+	+	v	v	-	-	+
<i>Lc. plantarum</i>	Frozen peas	-	-	+	-	+	-	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	Raw milk	+	+	+	+	v	+	v
<i>Lc. piscium</i>	Diseased rainbow trout yearling	+	+	-	+	+	+	-

*+, positive; -, negative; v, variable.

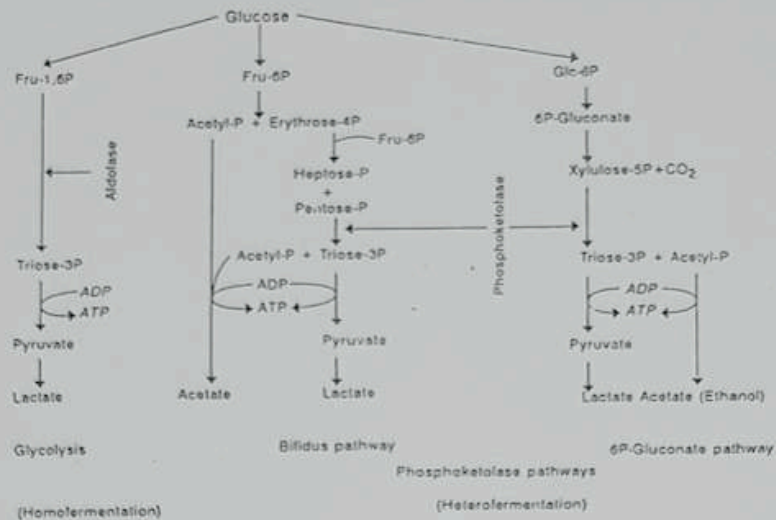


Figure 1.1 Schematic presentation of the main pathways of hexose fermentation in lactic acid bacteria (Reproduced from Kandler, 1983, by permission of Kluwer Academic Publishers.)

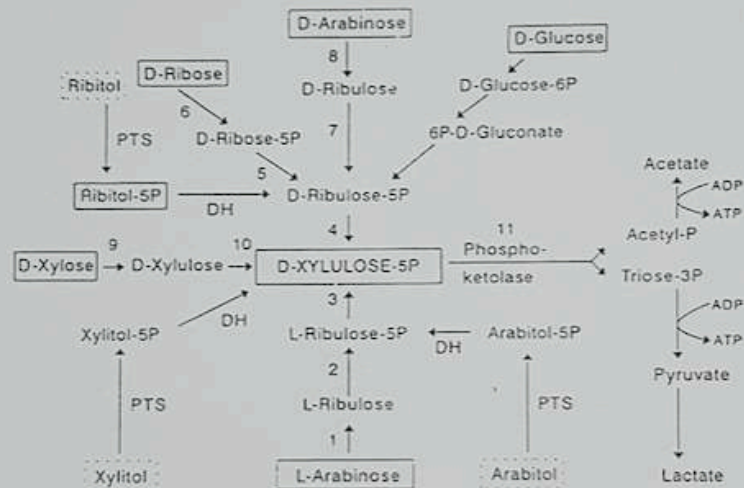


Figure 1.3 Pentose fermentations in lactic acid bacteria (Reproduced from Kandler, 1983, by permission of Kluwer Academic Publishers.) 1, L-Arabinose ketol-isomerase; 2, ATP: L-ribulose 5-phosphotransferase; 3, L-ribulose 5-phosphate 4-epimerase; 4, D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase; 5, D-ribose 5-phosphate ketol-isomerase; 6, ATP: D-ribose 5-phosphotransferase; 7, ATP: D-ribulose 5-phosphotransferase; 8, D-arabinose ketol-isomerase; 9, D-xylose ketol-isomerase; 10, ATP: D-xylulose 5-phosphotransferase; 11, D-xylulose 5-phosphate D-glyceraldehyde 3-phosphate lyase; DH, dehydrogenase.