

# 乳酸菌の保存方法に関する検討

バイオ系チーム 和田 潤, 泊 直宏, 高阪 千尋, 清野 珠美, 廣岡 青央

## 要 旨

研究所では昭和 30 年代から清酒造りに必要な清酒酵母の分譲を酒造メーカーに対して行ってきた。酵母と並んで有用微生物として、また発酵微生物として有名な乳酸菌においても同様に特徴ある高品質の発酵食品製造に用いるために研究所独自の乳酸菌ライブラリーの構築を行ってきた。発酵食品等から乳酸菌の単離を行い、本乳酸菌ライブラリーは、現在 500 株以上の乳酸菌で構成されている。

本研究では製品製造の生産スケジュールとスケールに臨機応変な対応を可能にし、常に安定して乳酸菌を提供できるように、乳酸菌の保存方法を種々の安定剤を用いて検討した結果、高い生存率を得たので報告する。

### 1. はじめに

近年、プロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）<sup>1)</sup>として注目を集めている乳酸菌は、古くから漬物、キムチ、味噌、醤油、酢、馴れ寿司、チーズ、ヨーグルト、パン、清酒といった多くの発酵食品に用いられてきた<sup>2)</sup>。これらの乳酸菌を用いた発酵食品の品質は発酵過程を担う乳酸菌の特性に大きく左右される。高品質で高付加価値の発酵食品製造を可能にするためには優れた乳酸菌が必要となる。そこで、研究所では優れた乳酸菌を獲得するために多様で充実した乳酸菌のコレクション、即ち乳酸菌ライブラリーを保有することとした。将来的に食品製造に利用され、人の口に入る可能性があることを鑑みて、既に食経験があり、安全が担保された発酵食品等から乳酸菌を採取及び単離し、これまでに 500 株以上の乳酸菌から構成される乳酸菌ライブラリーを構築した<sup>3-6)</sup>。

乳酸菌はブドウ糖（グルコース）などの糖質を分解利用（代謝）して乳酸を生成する細菌類の総称であり、嫌気性かつ栄養要求性が複雑で、生育するためには栄養が豊富に整っている必要がある。そのため、乳酸菌は食品製造を意識した条件で培養を行うと、乳酸菌と並んで発酵微生物として有名な酵母と比べて生育が安定しない一

面がある。研究所では昭和 30 年代より清酒製造に用いられる清酒酵母を市内の酒造メーカーに分譲している。将来的に酵母と同様に乳酸菌においても分譲を行おうとするならば、製品製造の生産スケジュールとスケールに臨機応変に対応することが求められる。食品製造のために安定して乳酸菌を提供できるように、必要なタイミングで必要量の菌を確保する方法を検討し、乳酸菌の実用化（分譲）システムを確立する必要がある。そこで、乳酸菌の十分量の安定供給を達成するために、食品製造への利用が可能な条件で乳酸菌の貯蔵を可能にするような保存方法を検討することとした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 使用菌株

研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から、これまでの研究より<sup>5)</sup>、酒母製造において適性を有すると示唆された 2 菌株を用いた（表 1）。

#### 2.2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌の培養は MRS 培地（DIFCO）（表 2）を用いて 30℃、静置で行った。

表 1 使用菌株

| 菌株番号  | 属種                               | 分離源       |
|-------|----------------------------------|-----------|
| F1304 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | キムチ(キュウリ) |
| F1401 | <i>Lactobacillus curvatus</i>    | 清酒(酒母)    |

表2 培地

MRS培地 (1L 55 g 中)

|            |      |   |
|------------|------|---|
| プロテアーゼペプトン | 10.0 | g |
| 肉エキス       | 10.0 | g |
| 酵母エキス      | 5.0  | g |
| ブドウ糖       | 20.0 | g |
| Tween 80   | 1.0  | g |
| クエン酸アンモニウム | 2.0  | g |
| 酢酸ナトリウム    | 5.0  | g |
| 硫酸マグネシウム   | 0.1  | g |
| 硫酸マンガン     | 0.05 | g |
| リン酸水素ニカリウム | 2.0  | g |

寒天培地とするときは粉末寒天15.0 g  
を加える。pH 6.3-6.7

2.3 乳酸菌の保存方法の検討

乳酸菌の保存はディープフリーザーを用いて -80℃で行った。凍結すると生存率が落ちることが予想されたので、冷凍保存時に用いるグリセロールやスクロースなど種々の安定剤を検討した。乳酸菌を MRS 液体培地で培養、集菌後に方法 I ~ VIII に示す保存候補液に懸濁した。

方法 I : MRS 液体培地に懸濁した。

方法 II : MRS 液体培地に安定剤として最終濃度 1% となるようにグリセロールを添加し、懸濁した。

方法 III : MRS 液体培地に安定剤として最終濃度 5% となるようにグリセロールを添加し、懸濁した。

方法 IV : MRS 液体培地に安定剤として最終濃度 10% となるようにグリセロールを添加し、懸濁した。

方法 V : MRS 液体培地に安定剤として最終濃度 10% となるようにスクロースを添加し、懸濁した。

方法 VI : 1% グルタミン酸ナトリウム水溶液に懸濁した。

方法 VII : 2% 可溶性デンプン水溶液に懸濁した。

方法 VIII : 20% スクロース, 0.9% 塩化ナトリウム, 0.5% アスコルビン酸ナトリウム水溶液に懸濁した。

上記保存候補液を用いて -80℃にて保存する前と保存一か月後に MRS 寒天培地を用いて培養を行った。出現したコロニーを数え、生菌数をそれぞれ算出した。保存

する過程の前後での生菌数から生存率 (保存後の生菌数 / 保存前の生菌数 × 100) (%) を算出した。

3. 結果と考察

本研究に用いた *Leuconostoc mesenteroides* F1304 株 (以下 F1304 株) と *Lactobacillus curvatus* F1401 株 (以下 F1401 株) はどちらも MRS 培地を用いた 30℃ の培養で良好に生育した。MRS 寒天培地を用いた培養では白色のコロニーを形成した。生菌数の換算は MRS 液体培地を用いて乳酸菌懸濁液を数段階に希釈し、作製した希釈系列を MRS 寒天培地にそれぞれ 100 μL ずつ塗布して培養を行った。出現したコロニーの数が三桁以上の非常に多い場合や二桁に満たない非常に少ない場合を除いて、適度にコロニーを形成した希釈濃度のプレートを採用しコロニーを数えた (図 1)。凍結時の安定剤は食品製造の観点から食品添加物として使用できるものを用いた。

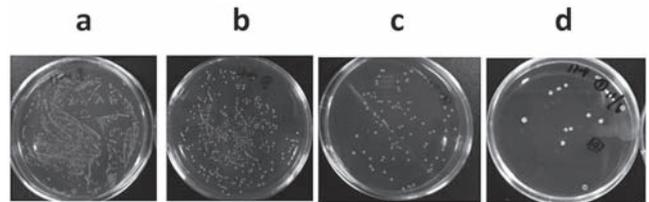


図 1 MRS 寒天培地を用いた培養 (乳酸菌)  
生菌数の算出には乳酸菌を MRS 寒天培地で培養し、c のように適当な数のコロニーが出現したプレートを採用した。

F1304 株 F1401 株はどちらもグリセロールやスクロースを添加したときに約 80% 以上の非常に高い生存率を示した。グルタミン酸ナトリウムについて F1401 株は 91% と非常に高い生存率を示したが、F1304 株の生存率は 62% だった。一方で、可溶性デンプンについては F1304 株の生存率が 60% だったのに対して F1401 株の生存率は 25% と低かった (表 3)。結果、用いた安定剤によっては乳酸菌の生存率 80% 以上を達成することができた。細菌のフリーズストック作製時に凍結防止剤としてよく用いられるグリセロールは低濃度でも添加することによってどちらの乳酸菌でも非常に高い生存率を示した。安定剤としてグリセロールやスクロース利用の可能性が示唆された。特に食品製造に用いることを考慮すると添加する量が少ない方が好ましいので、グリセロールを 1% の濃度で添加した時の F1304 株と F1401 株の生存率がそれぞれ 79% と 100% であったことは十分実用

表3 保存方法と生存率

| 方法   | 安定剤   | <i>L. mesenteroides</i> | <i>L. curvatus</i> | (%) |
|------|---|-------------------------|--------------------|-----|
|      |   | F1304                   | F1401              |     |
| I    | 非添加   | 51                      | 59                 |     |
| II   | 1% グリセロール                                     | 79                      | 100                |     |
| III  | 5% グリセロール                                     | 85                      | 100                |     |
| IV   | 10% グリセロール                                    | 87                      | 100                |     |
| V    | 10% スクロース                                     | 86                      | 100                |     |
| VI   | 1% グルタミン酸ナトリウム                                | 62                      | 91                 |     |
| VII  | 2% 可溶性デンプン                                    | 60                      | 25                 |     |
| VIII | 20% スクロース, 0.5% アスコルビン酸ナトリウム,<br>0.9% 塩化ナトリウム | 25                      | 44                 |     |

に耐えうることが分かった。

一方で、本研究で試料として用いた2菌株において用いる安定剤ごとに生存率の傾向が異なることから、乳酸菌が菌株によって冷凍耐性が異なることが考えられる。データとしては示さないが、実際に研究所保有乳酸菌ライブラリーの免疫学的に特徴を有するとして選抜された *Lactobacillus plantarum* F706 株を用いて同様の実験を行ったところ、グリセロールやスクロースでは高い生存率を示したが、それ以外の安定剤については本研究で用いた2菌株と比べて非常に低かった。このことから乳酸菌が菌株によって冷凍耐性が異なることが示唆された。

#### 4. まとめ

本研究において安定剤を選択することで酒母製造に適性を有すると考えられる F1304 株と F1401 株は1か月間の保存期間を経た後も、非常に多くが生存することが分かった。しかしながら、乳酸菌の多くの特性が菌株ごとに異なるように冷凍耐性についても乳酸菌の菌株ごとに異なることが示唆された。

#### 参考文献

- 1) G. Reid et al.: Clinical Microbiology Reviews, 16, 658 (2003)
- 2) 乳酸菌研究集談会 編, "乳酸菌の科学と技術", p. 229, 学会出版センター (1996)
- 3) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.5, p.87 (2015)
- 4) 和田潤: 酒研会報, No.55, p.9 (2016)
- 5) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.6,

p.87 (2016)

- 6) 和田潤: 酒研会報, No.56, p.29 (2017)