

乳酸菌の保存方法に関する検討（第2報）

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

乳酸菌は、発酵微生物・プロバイオティクスとして注目されている。研究所では、新規発酵食品製造に役立てることを目的に、発酵食品等から乳酸菌の単離を行い、これまでに500株以上を有する独自の乳酸菌ライブラリーの構築を行ってきた。

本ライブラリーを実際の発酵食品製造に適用（活用）するためには、製造時期・製造量に応じた乳酸菌の安定供給が求められる。そこで本研究では、乳酸菌の安定した提供、すなわち分譲システムの確立を目指し、第一報に引き続き、種々の安定剤を用いた新たな保存方法について検討した結果を報告する。

1. はじめに

我々ヒトは、多くの微生物に囲まれ、ヒトの生活に役立つ働きをするものを有用微生物、害をなすものを有害微生物と呼んでいる。我々が有用微生物の恩恵に与るものとして発酵食品がある。古くから我々は多くの発酵食品を食してきた。発酵食品の製造工程において、酵母、カビや細菌などの発酵微生物が一種類もしくは複数種類関与している。発酵食品の品質にはこれら発酵微生物が深く関わっており、高品質で高付加価値な発酵食品には有用微生物の存在が必要不可欠である。

善玉菌として多くのヒトに好印象を持たれている乳酸菌も発酵微生物として有名な細菌であり、漬物、キムチ、味噌、醤油、酢、馴れ寿司、チーズ、ヨーグルト、パン、清酒など多くの発酵食品の発酵過程に関与している¹⁾。更に、近年、乳酸菌は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）²⁾として注目を集めており、発酵食品を高付加価値化する役割を担うことも多い。高品質で高付加価値の発酵食品製造を可能にするための優れた乳酸菌を、市内を中心とした食品製造業者に提供するために、研究所では優れた乳酸菌を獲得するべく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の構築を目指した。現在、研究所では食品から単離された500株以上の乳酸菌から構成される独自の乳酸菌ライブラリーを保有している^{3,6)}。

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。必要なタイミングで必要量の乳酸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。第1報⁷⁾では、-80℃冷凍保存下における各種安定剤の影響について検討した結果、菌株によって冷凍耐性が異なること、および安定剤としてグリセロールやスクロースを用いた場合は、複数の乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* F706株、*Leuconostoc mesenteroides* F1304株、*Lactobacillus curvatus* F1401株）において1か月保存後も高い生存率を有することを報告した。しかし、-80℃冷凍保存するためには、高価なディープフリーザーが必要となり、食品製造を行う事業所の中には設備的に完備するのが困難な事業所も存在する。

一方、多くの事業所が冷蔵庫は保有し、4℃での保存は可能である。そこで、本研究では、多くの事業所での実際の使用を鑑みて、研究所保有乳酸菌の4℃における保存方法について、更なる検討を行った結果を報告する。

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⁵⁾、酒母製造において適性を有すると示唆された2菌株(*Leuconostoc mesenteroides* F1304株、*Lactobacillus curvatus* F1401株)と免疫学的に興味深い1菌株(*Lactobacillus plantarum* F706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。

2.3 乳酸菌の保存方法の検討

多くの事業所が冷蔵庫は保有するので、4℃での保存を可能にする方法を検討することとした。本研究で用いた*Lactobacillus curvatus* F1401株もそうであるが、30℃の培養後に冷蔵庫で保管していると1週間ほどで活性を失ってしまって種菌として使えなくなる菌株がある。この問題を解決するために凍結乾燥後に4℃で保管することを考えた。凍結乾燥の操作の過程で乳酸菌の生存率が落ちることが予想されるため、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、以下に示す方法I~Ⅷの保存候補液に懸濁し、凍結を行った後、凍結乾燥機による乾燥後に4℃で保管した。

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凍結乾燥機による乾燥後に4℃で保存した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

本研究で検討した*Lactobacillus plantarum* F706株(以下F706株)、*Leuconostoc mesenteroides* F1304株(以下F1304株)、*Lactobacillus curvatus* F1401株(以下F1401株)、全ての乳酸菌は、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100μL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)。凍結乾燥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。

F1304株とF1401株はどちらもグリセロールを1%添加した時に67%と58%の高い生存率を示したが、F706株の生存率は先の2菌株と比べて低い21%だった。グリセロール添加濃度5%になるとF1304株は20%、F1401株は0%、F706株は10%となった。グリセロール添加濃度が10%になるとF1304株のみが唯一生存確認できたものの、生存率は1%であった。また、F1304

表1 使用菌株

菌株番号	属種	分離源
F706	<i>Lactobacillus plantarum</i>	糠漬け(ミズナス)
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 55g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15.0gを加える。pH 6.3-6.7

株と F1401 株はどちらもグルタミン酸ナトリウムを 1% 添加した時にも 46% と 48% の高い生存率を示したが、F706 株は 3% と低い生存率だった。一方、F706 株と F1401 株はスクロースを 10% 添加した時に 61% と 52% の高い生存率を示したのに対して、F1304 株は 34% という低い生存率であった。(表 3)。

前報の -80℃ における冷凍保存の検討⁷⁾ においては、グリセロール濃度 1~10% で高い生存率を示し、その濃度依存性は認められなかったが、本研究で用いた乳酸菌 3 菌株全てにおいて原因は不明だが、添加するグリセロール濃度が高くなるほど、用いた乳酸菌 3 菌株全てにおいて生存率は低くなる傾向が示された。また、本研究における凍結乾燥後 4℃ での保存法では安定剤を加えた多くの試験方法において前報の -80℃ 冷凍保存時に比べて生存率が低く、凍結に加えて乾燥という追加のストレスがかかることが原因の一つと考えられた。前報と同様に安定剤により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や乾燥耐性が異なると考えられる。種菌としての利用を考える時、培養後に十分量の菌

数になれば良いので、必ずしも高い生存率を必要としないが、菌株ごとに最適な安定剤を用いることによって本研究で使用した乳酸菌全ての菌株で保存後も 50% 以上の高い生存率を達成することができた。ディープフリーザー (-80℃) を用いずに、多くの事業所で利用できる冷蔵庫 (4℃) での保存でも種菌として十分使用できることが示唆された。

4. まとめ

用いる安定剤や保存方法によって菌株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や乾燥耐性が異なると考えられた。しかしながら、菌株ごとに最適な安定剤を適切な濃度で用いれば、1 か月の保存期間において、高い生存率を維持することが可能であり、食品製造において多くの事業所で種菌として十分使用できることが示唆された。

参考文献

- 1) 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)
- 2) G. Reid et al.: Clinical Microbiology Reviews, **16**, 658 (2003)
- 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)
- 7) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.8, p.83 (2017)

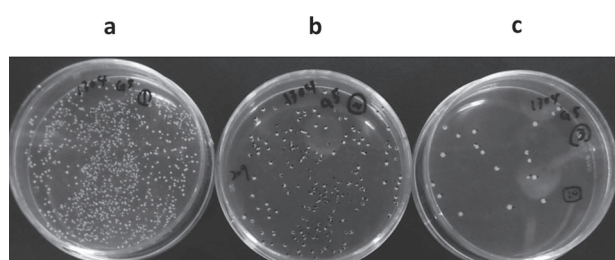


図 1 MRS 寒天培地を用いた培養 (乳酸菌) 生菌数の算出には乳酸菌を MRS 寒天培地で培養し、b のように適当な数のコロニーが出現したプレートを採用した。

表 3 保存方法と生存率

方法	安定剤	<i>L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. curvatus</i>	生存率 (%)
		F706	F1304	F1401	
I	非添加	0	22	1	
II	1% グリセロール	21	67	58	
III	5% グリセロール	10	20	0	
IV	10% グリセロール	0	1	0	
V	10% スクロース	61	34	52	
VI	1% グルタミン酸ナトリウム	3	46	48	
VII	2% 可溶性デンプン	0	1	0	
VIII	20% スクロース, 0.5% アスコルビン酸ナトリウム, 0.9% 塩化ナトリウム	0	0	0	