

食品製造に適した乳酸菌用培地作製に関する検討

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, 山本 佳宏

要 旨

研究所では特徴ある清酒づくりに貢献する清酒酵母の開発・育種を行い、取得した有用酵母を昭和30年代から酒造メーカーに分譲してきた。一方、酵母と並んで発酵微生物として有名な乳酸菌についても優良な発酵食品製造に寄与す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。現在400株以上の乳酸菌で構成された本ライブラリーを活用するために、食品製造に用いることができる乳酸菌用の安定した培地作製を目指し、種々の培地を用いて乳酸菌の生育性試験を行った結果、増殖に有効な成長因子を見出すことができた。

1. はじめに

乳酸菌は古くから多くの発酵食品に用いられ、我々にとって非常に安心で馴染みのある微生物である一方¹⁾、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）としても注目を集めている²⁾。その効能も多岐にわたり^{3) -6)}、多様な機能性を謳った乳酸菌を用いた機能性食品製造が盛んに行われており、様々な乳酸菌関連商品が市場を賑わしている。現に、日本健康・栄養食品協会の調べによると、特定保健用食品の2015年度の市場規模は6000億円以上であるが、そのうちのおよそ半分に及ぶ3000億円以上を乳酸菌関連が占めている。

これらの乳酸菌を用いた発酵食品や健康食品の品質は発酵過程を担う乳酸菌や添加される乳酸菌の特性に大きく左右される。つまりは、特徴ある発酵食品製造や商品化のコンセプトに合致しつつ、安定した製品製造を可能にするためには、製造に最適な乳酸菌を用いる必要がある。そのためには、優れた乳酸菌の選抜を可能にするために、多様で充実した乳酸菌のコレクションを保有する必要がある。

そこで、研究所では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単離及び採取し、これまでに400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^{7) -10)}。

しかしながら、乳酸菌は嫌気性で複雑な栄養要求性を有し、酵母と比較して生育にも時間を要する上に培養が困難かつ不安定という特性を有する。特に、研究においては栄養要求性を満たすために、多種類の化合物を混合して培地を作製することも可能であるが、食

品製造を意図して培養を行うと条件によっては良好に生育しなかったり、培養が安定しなかったりする。そこで、先の研究所が保有する乳酸菌ライブラリーの中から特徴的な乳酸菌を数株選んで、本乳酸菌に対して培地組成を変えた種々の培地を作製し、乳酸菌の増殖具合を検討した。

本研究は将来的に乳酸菌の安定した提供を可能にするための、食品製造に利用可能かつ生育が安定した培地作製のための研究であり、昭和30年代より研究所で行ってきた酵母の分譲事業同様に研究所独自の乳酸菌を業界に提供することを目指すために行ったものである。

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^{7) -10)}の中から免疫学的に優れた *Lactobacillus plantarum* F706株と酒母製造において適性を有する *Leuconostoc mesenteroides* F1304株と *Lactobacillus curvatus* F1401株の3菌株を用いた。

2.2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌の培養にはMRS培地（DIFCO）とMRS培地とロゴサ寒天培地の組成（表1）を参考にして、2% グルコース、1% ペプトン、1% 酵母エキス、1% 肉エキス、0.6% 酢酸ナトリウム三水和物、0.03% リン酸二水素カリウム、0.03% リン酸水素二カリウム、0.01% 硫酸マグネシウム、2% クエン酸アンモニウム、1% Tween80を添加もしくは非添加で種々の培地を作製した。また、培養は30℃、静置で行った。

表1 乳酸菌用培地の組成

MRS培地 (1L 55g中)		ロゴサ寒天培地 (1L 82g中)	
プロテアーゼペプトン	10.0 g	トリプトン	10.0 g
肉エキス	10.0 g	酵母エキス	5.0 g
酵母エキス	5.0 g	ブドウ糖	20.0 g
ブドウ糖	20.0 g	Tween 80	1.0 g
Tween 80	1.0 g	リン酸二水素カリウム	6.0 g
クエン酸アンモニウム	2.0 g	クエン酸アンモニウム	2.0 g
酢酸ナトリウム	5.0 g	酢酸ナトリウム(無水)	17.0 g
硫酸マグネシウム	0.1 g	硫酸マグネシウム	0.575 g
硫酸マンガン	0.05 g	硫酸マンガン	0.12 g
リン酸水素二カリウム	2.0 g	硫酸第一鉄	0.034 g
		寒天	20.0 g

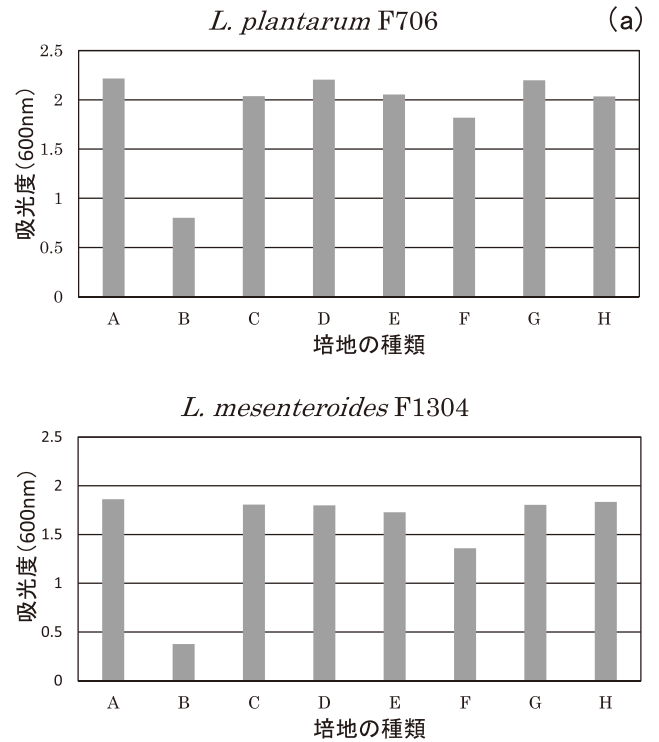
2.3 乳酸菌の生育性試験

生育性試験は乳酸菌を培養後、分光光度計を用いて培養液の濁度(吸光度600nm)を測定し、菌の生育(増殖具合)の指標とした。

3. 結果と考察

MRS培地とロゴサ寒天培地の組成(表1)を参考にしてグルコース、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、酢酸ナトリウム三水和物、リン酸水素カリウム(リン酸二水素カリウムとリン酸水素二カリウム)、硫酸マグネシウムを全て添加した培地(図1のA)、1種類ずつ除いた培地(図1のB~H)それぞれに対して*Lactobacillus plantarum* F706株、*Leuconostoc mesenteroides* F1304株、*Lactobacillus curvatus* F1401株の3菌株を接種して増殖具合を調べた(図1)。結果、*Lactobacillus plantarum* F706株、*Leuconostoc mesenteroides* F1304株は用いた全ての培地に対して増殖した。構成化合物を全て添加した培地(図1のA)に最も良く増殖し、グルコースを添加しなかった培地(図1のB)が最も増殖しなかった。構成化合物に混合物が多いため、どれか一つを除いただけでは増殖が完全に阻害されることはなかった。グルコースを除くことによって炭素源が大幅に減少して、最も増殖を阻害したことが考えられる。一方、*Lactobacillus curvatus* F1401株は全ての培地に対してほとんど増殖しなかった。

この結果からMRS培地とロゴサ寒天培地(表1)にあって、今回作製した培地成分には含まれていない化合物の*Lactobacillus curvatus* F1401株の増殖に対す

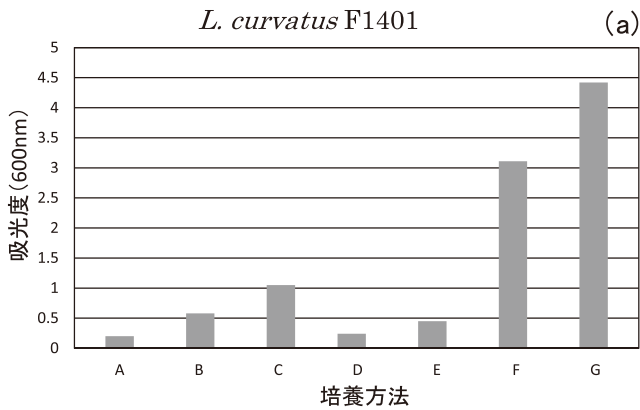


	A	B	C	D	E	F	G	H
グルコース	+	-	+	+	+	+	+	+
ペプトン	+	+	-	+	+	+	+	+
肉エキス	+	+	+	-	+	+	+	+
酵母エキス	+	+	+	+	-	+	+	+
酢酸ナトリウム	+	+	+	+	+	-	+	+
リン酸水素カリウム	+	+	+	+	+	+	-	+
硫酸マグネシウム	+	+	+	+	+	+	+	-

図1 種々の培地を用いての乳酸菌の生育性試験
(a) 乳酸菌を種々の培地で培養した時の生育具合(濁度)を示したもの。
(b) 種々の培地の構成成分を図示したもの。

る深い関与が疑われた。そこで、菌の添加量を変えることによっても増殖に変化が出ることも考えられたので、前培養から本培養への菌の接種量と先の実験の培地にあらたにクエン酸アンモニウムとTween 80を添加して*Lactobacillus curvatus* F1401株の増殖を試験した。また、本培養への菌の接種量が変わると前培養のMRS培地を本培養に持ち込む量が変わり、影響がでることを考慮して、前培養後、菌を洗浄してから本培養に用いる試験も行った(図2)。

結果、前培養からの菌の接種量によっても増殖具合は変化したが、洗浄によって減少したことから、本増殖にはMRS培地の持ち込みが影響していると考えられた。一方、クエン酸アンモニウムとTween 80を添



- (b)
- A 植菌 1%
 - B 植菌 5%
 - C 植菌 10%
 - D 植菌 5%、洗浄後
 - E 植菌 10%、洗浄後
 - F 植菌 5%、クエン酸アンモニウム、Tween 80 添加
 - G 植菌 10%、クエン酸アンモニウム、Tween 80 添加

図2 種々の培養条件での乳酸菌の生育性試験

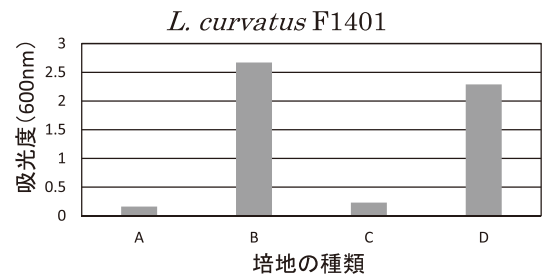
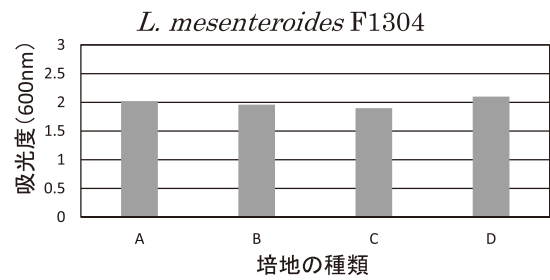
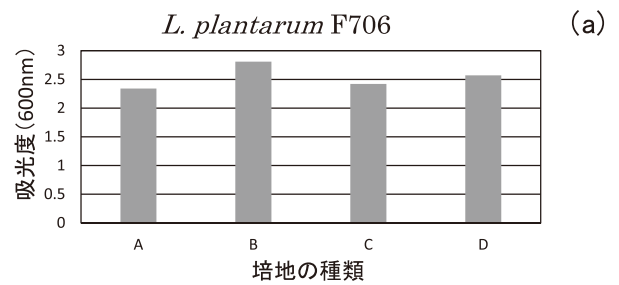
- (a) 乳酸菌を種々の培養条件で培養した時の生育具合(濁度)を示したもの。
 (b) 種々の培地の培養条件を図示したもの。

加することによって菌の接種量による影響よりもはるかに増殖するようになったことから、やはり、クエン酸アンモニウムもしくは、Tween 80のどちらかが *Lactobacillus curvatus* F1401株の増殖に深く関わっていることが示唆された。

そこで、クエン酸アンモニウムとTween 80のどちらがより、乳酸菌の生育に影響を及ぼしているかを調べるためにクエン酸アンモニウムとTween 80を先までの試験で用いた培地に追加で両方添加、片方添加と両方非添加の培地を作製し、*Lactobacillus plantarum* F706 株、*Leuconostoc mesenteroides* F1304 株、*Lactobacillus curvatus* F1401株の3菌株を接種してそれぞれの菌株の増殖を調べた(図3)。

結果、Tween 80を添加した時に全ての乳酸菌株において濁度が増加した。特に *Lactobacillus curvatus* F1401株においてはクエン酸アンモニウムのみを添加した時には目立った増殖が観察されなかったが、クエン酸アンモニウムとTween 80を両方添加した時に最も増殖し、Tween 80だけを添加した時にも大きく増殖の改善が見られた。乳酸菌の生育、特に *Lactobacillus curvatus* F1401株の生育にはTween 80が必須であることが分かった。

Tweenは利用価値が広く、食品だけでなく多岐に



(b)

	A	B	C	D
グルコース	+	+	+	+
ペプトン	+	+	+	+
肉エキス	+	+	+	+
酵母エキス	+	+	+	+
酢酸ナトリウム	+	+	+	+
リン酸水素カリウム	+	+	+	+
硫酸マグネシウム	+	+	+	+
クエン酸アンモニウム	-	+	+	-
Tween 80	-	+	-	+

図3 種々の培地(Tween 80 添加・非添加など)を用いての乳酸菌の生育性試験

- (a) 乳酸菌を種々の培地で培養した時の生育具合(濁度)を示したもの。
 (b) 種々の培地の構成成分を図示したもの。

わたって活用されている界面活性剤である。微生物の培地におけるTween 80の役割として菌を培地中に均一に分散発育させる、膜透過性に干渉して栄養分の取り込みに影響を与えるといったことが考えられる。しかし、*Lactobacillus curvatus* F1401株に対してTween 80を添加した時の劇的な増殖の改善から *Lactobacillus curvatus* F1401株はTween 80そのものを栄養分として必要としたと考えられる。

Tween 80はモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンという別名を持つように構造中にオレイン酸を有し、脂肪酸の供給源となり得る。また、オレイン酸が乳酸菌の成長因子となると報告されている¹¹⁾。*Lactobacillus curvatus* F1401株はTween 80の添加によって本研究で試験した他の2株と比べて大きく増殖が改善したことから、脂肪酸の代謝において他の2株とは異なることが示唆された。現に*Lactobacillus plantarum* F706株と*Lactobacillus curvatus* F1401株の同属種でゲノム情報が全て公開されている*Lactobacillus plantarum* WCFS1株と*Lactobacillus curvatus* FBA2株を比較するとゲノムサイズがそれぞれ3.31Mbと1.85Mb、タンパク質数が3013と1711と大きく差がある。多くの*Lactobacillus plantarum*種が有していて、*Lactobacillus curvatus*種が有していない脂肪酸代謝に関わるようなタンパク質が存在し、そのタンパク質の欠損のために*Lactobacillus curvatus* F1401株はTween 80を添加しないと増殖できないことが考えられた。

4. まとめ

食品製造に利用可能かつ生育が安定した培地作製のための基礎研究として、研究所の乳酸菌ライブラリーの中から代表的な乳酸菌菌株3株を用いて生育性試験を種々の培地に対して行った結果、Tween 80が有効な成長因子として働くことが分かった。特に、*Lactobacillus curvatus* F1401株はTween 80を添加しない場合は、増殖しなかった。本研究の結果をもとに今後、食品製造に可能な乳酸菌分譲用培地の開発を行う。

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) Y. Kikuchi et al.: *PLoS ONE*, **9**, e86416 (2014)
- 4) K. Shida et al.: *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **115**, 278 (1998)
- 5) J. E. Kim et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 1227 (2007)
- 6) N. Yamamoto et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 776 (1994)

- 7) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.5, p.87 (2015)
- 8) 和田潤: 酒研会報, No.55, p.9 (2016)
- 9) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.6, p.87 (2016)
- 10) 和田潤: 酒研会報, No.56, p.29 (2017)
- 11) W. L. Williams et al.: *J. Biol. Chem.*, **170**, 619 (1947)