

プロピオン酸菌の分離および当該微生物 を利用した発酵乳の開発

川上 誠, 河野慎一, 山田加一朗, 渡邊 治

Novel *Propionibacterium* Strain and
its Application to Fermented Milk

Makoto Kawakami, Shin-ichi Kono,
Kaichiro Yamada and Osamu Watanabe

A novel *Propionibacterium* strain was isolated from raw milk and other dairy products in Hokkaido, Japan. Using lactic acid as the carbon source, this isolated strain showed rapid growth. The viable cell count of *Bifidobacterium* was greater by co-culture with this strain than with *Bifidobacterium* alone. The acidity of the fermented milk from which this strain was cultured was low and its flavor was weak. However, the flavor of yogurt was improved by culturing it with a commercial dairy lactic acid bacterium.

北海道では乳製品製造が盛んに行われており、ヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品も数多く生産されている。発酵乳製品の製造には乳酸菌を主体とするスターターが利用されており、現在その多くが輸入品に依存していることから、独自の発酵乳製品用スターター開発が望まれている。生乳、乳製品や酪農環境には乳酸菌以外にも数多くの微生物が存在しており、発酵乳製品に利用可能な有用微生物も少なくない。プロピオン酸菌はプロピオン酸を生産する微生物として乳環境や人の腸管、皮膚などに存在するが、その知名度は乳酸菌に比べ低く食品での利用は極めて限定的である。しかし、プロピオン酸菌の機能性としてビフィズス菌増殖効果、整腸作用などが報告されており^{1)~3)}、今後、発酵乳製品など各種発酵食品への利用が期待される。今回、北海道内の乳素材に由来するプロピオン酸菌を分離し、これを利用した発酵乳の開発を検討した。

1. 実験方法

(1) 酸生成菌の分離

北海道内の生乳 2 種類、ナチュラルチーズの中間製品 3 種類、ナチュラルチーズ製品 2 種類より GYP 白亜寒天培地⁴⁾を用いて酸生成菌を分離した。分離株は長島

ら^{5),6)}の方法に準じて 16 SrDNA の 5' 末端から約 1,500 bp の塩基配列を決定し、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベースと照合することによって同定した。分離菌のグラム染色、細胞の形態観察、カタラーゼ試験、硝酸還元試験、糖類発酵性試験の形態的、生理的試験は乳酸菌実験マニュアル⁴⁾に準じて実施した。

(2) 供試菌の培養

分離プロピオン酸菌は金子ら²⁾の方法に準じ、TPY 培地²⁾を用いて 35°C で培養した。炭素源の違いによる増殖性の確認には TPY 培地を基礎培地として炭素源をグルコースに替えてラクトース、乳酸ナトリウムに置換した培地を用いた。ビフィズス菌培養液は *Bifidobacterium bifidum* NBRC100015 を TPY 培地で 35°C、24 時間嫌気培養することで調製した。ビフィズス菌の菌数は TOS プロピオン酸寒天培地 (栄研化学) を用いて計測した。

(3) 有機酸の測定

培養によって生成される各種有機酸は OA-pack カラムを用い、ブロムチモールブルー (BTB) によるポストカラム反応型検出法による高速液体クロマトグラフィによって測定した。

(4) プロピオン酸菌の酸耐性試験

a. 人工胃液耐性試験

炭素源を乳酸ナトリウムに置換した TPY 培地を用いて分離プロピオン酸菌を 35°C、24 時間培養した。培養液に 4% ペプシン溶液を加え、6 N 塩酸で pH 2 あるいは pH 3 に調整後、全量を 10 ml にし、これを 37°C、5 時間まで静置した。その間の生菌数を GYP 寒天培地にて測定した。

b. 人工腸液耐性試験

上述の人工胃液 (pH 3.0) で 3 時間処理後のプロピオン酸菌溶液を 0.4% の胆汁末を含む人工腸液に添加して 37°C、24 時間静置した。その間の生菌数を GYP 寒天培地にて測定した。

(5) 発酵乳の調製方法

分離したプロピオン酸菌を 10% 滅菌還元脱脂乳で 42°C、18 時間培養したものを発酵乳用プロピオン酸菌スターターとした。また、乳酸菌カルチャー YC-380 (クリスチャン・ハンセン) を 10% 滅菌還元脱脂乳で 35°C、6 時間培養したものを乳酸菌スターターとした。プロピオン酸菌あるいは乳酸菌による試作発酵乳は 10% 滅菌還元脱脂乳に上述スターターを 1% (v/v) 添加し、35°C で発酵させた。プロピオン酸菌と乳酸菌の混合発酵乳は同様に両スターターをそれぞれ 1% (v/v) 混合し、35°C で

発酵させた。ヨーグルトの pH は pH メーター (TOA 社製) を用いて測定した。酸度は滴定法により測定し、乳酸酸度に換算した⁷⁾。

2. 実験結果および考察

(1) プロピオン酸菌の分離および分離株の性質

北海道内の生乳、ナチュラルチーズから酸生成菌 208 株を分離し、16 SrDNA の塩基配列の結果からプロピオン酸菌 *Propionibacterium freudenfeichii* と推定されるグラム陽性の短桿菌 5 株 (PF 1~PF 5) を分離した。このうち乳糖発酵性を示す PF 2 株を試験に利用した。PF 2 株は硝酸還元性、乳糖発酵性を示すことから *Propionibacterium freudenfeichii* に属する 3 亜種のうち *Propionibacterium freudenfeichii* subsp. *shermanii* の近縁種と推定された⁸⁾。

糖発酵試験 (表 1) から PF 2 株はグルコース、フラクトース、ガラクトース、ラクトース、シュクロースを利用することが可能であり、ラクトースを含有する牛乳などの発酵に利用できることが示された。また、ビフィズス菌の増殖に寄与するラフィノースなどのオリゴ糖を利用しないことから、発酵乳での利用の場合、ビフィズス菌と競争することなく利用できる可能性が示された。炭素源の違いによる増殖性は、PF 2 株は炭素源としてグルコース、ラクトースよりも乳酸を用いた TPY 培地で急速に生育し、プロピオン酸を生成した (図 1)。PF 2 株の培養には炭素源として乳酸が有効であり、乳製品での利用の場合、牛乳中のラクトースを乳酸に変換することが PF 2 株の培養に有効と考えられ、乳酸菌と PF 2 株を逐次培養または混合培養することが PF 2 株を効率よく利用できる方法と考えられた。

(2) ビフィズス菌増殖促進効果

Bifidobacterium bifidum NBRC100015 を単独培養、PF 2 株との混合培養した結果を図 2 に示した。TPY 培地での培養 12 時間目のビフィズス菌数はビフィズス菌

単独培養で 1.2×10^7 cfu/ml、PF 2 株との混合培養で 8.8×10^7 cfu/ml であり、PF 2 株と混合培養することでビフィズス菌数が増加する傾向が認められた。その後両培養方法ともに培養 12 時間目をピークとしてビフィズス菌数が減少した。これは培養によって生成される乳酸、酢酸などの有機酸によりビフィズス菌の生育抑制や細胞の死滅が起こるためと考えられた。混合培養では培養期間中を通して検出される乳酸は低く 0.4% 以下に抑えられていた。これはビフィズス菌の生成する乳酸を PF 2 株が速やかに消費していることに起因すると考えられ、炭素源としてラクトースを使用すると増殖の遅い PF 2 株がビフィズス菌の産生する乳酸を炭素源として利用することによって旺盛に増殖していることが示唆された。複数の微生物を発酵に利用する場合、微生物間の相互作用が重要になる。本研究で分離したプロピオン酸菌 PF 2 株は乳酸菌の産生する乳酸を利用し自身の増殖を活発にさせ、また、ビフィズス菌との混合培養によってビフィズス菌数を増加させる。これらのことから乳酸菌と PF 2

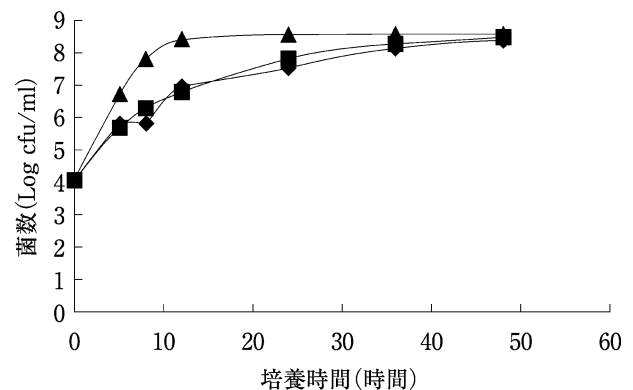


図 1 炭素源の違いによる PF 2 株の増殖性

PF 2 株をグルコース (◆)、ラクトース (■)、乳酸 (▲) を炭素源とした TPY 培地を用い 35°C 培養、菌数を測定した。

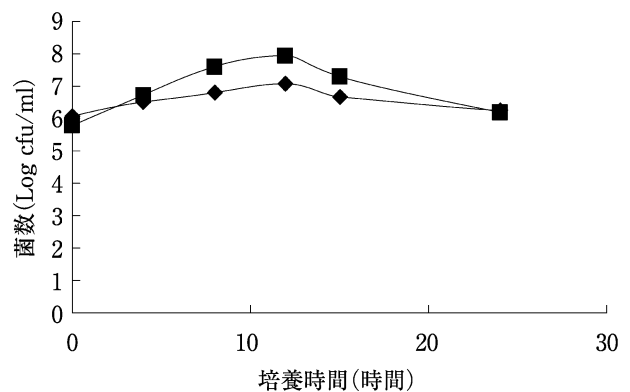


図 2 ビフィズス菌増殖性

B. bifidum NBRC100015 を TYP 培地で 35°C 嫌気培養し、菌数を測定した。単独培養 (◆)、PF 2 株との混合培養 (■)

表 1 PF 2 株の糖類発酵試験

糖の種類	資化性	糖の種類	資化性
L-アラビノース	-	セルビオース	-
D-キシロース	-	マルトース	-
グルコン酸ナトリウム	-	メルビオース	-
グルコース	+	シュクロース	+
フルクトース	+	ラフィノース	-
ガラクトース	+	サリシン	-
マンノース	-	トレハロース	-
ラムノース	-	マンニトール	-
ラクトース	+	ソルビトール	-

株および PF 2 株とビフィズス菌の協調関係はともに片利共生関係にあると考えられた。

(3) 耐酸性試験

PF 2 株で人工胃液および人工腸液による耐酸性試験を行い、プロバイオティクスとして利用できるかを検討し、それぞれ図 4 及び 5 にその結果を示した。人工胃液試験において、5 時間後の PF 2 株の生菌数は pH 2.0 でほぼ 1/1,000 に減少したが、pH 3.0 では 5 時間後も生菌数の減少は認められなかった。ヒトの胃内の pH は摂食時には pH 3~5 程度であり、消化物は 2 時間程度で十二指腸へ移送されることから、食品として利用する場合、分離菌株は十分な胃酸耐性を備えていると考えられる。しかし、人工腸液耐性試験から分離菌株は 0.4%胆汁酸中では 6 時間程度でほとんど死滅してしまうことが確認された。ヒトの腸内では消化物の滞留は 24 時間程度であり、本株の胆汁酸耐性は十分とはいえなかった。今後、プロピオン酸菌のプロバイオティクスとして利用を図るためには胆汁酸耐性、腸内定着性などの検討が必要である。

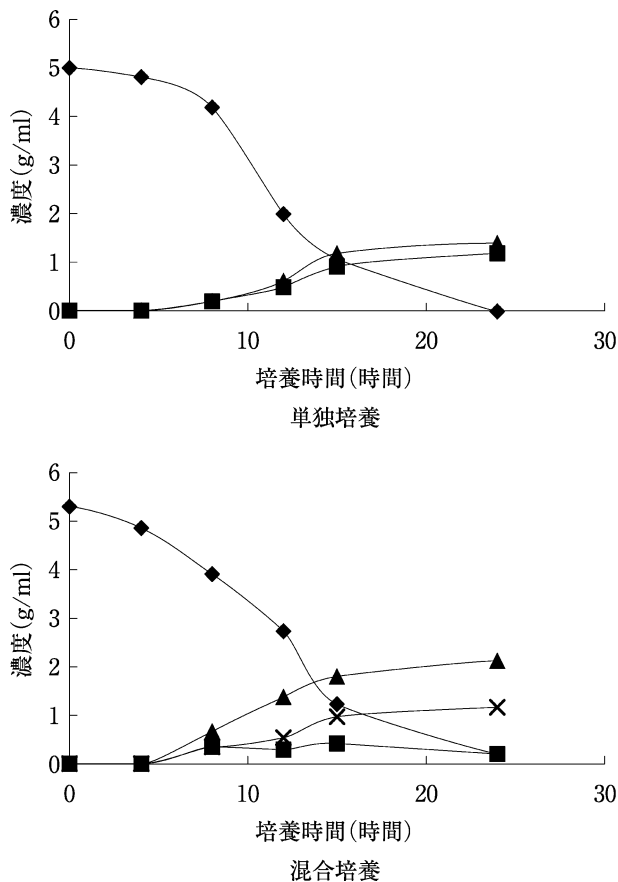


図 3 ビフィズス菌培養によって生成される有機酸

- (1) *B. bifidum* NBRC100015 单独培養
 (2) PF 2 株との混合培養
 ラクトース (◆), 乳酸 (■), 酢酸 (▲), プロピオン酸 (×)

(4) 発酵乳の試作

PF 2 株単独で試作した発酵乳と乳酸菌 YC 380 で試作した発酵乳の pH はそれぞれ培養 6 時間で pH 5.46, pH 4.32 培養 8 時間で pH 4.26, pH 4.01 となった (図 5)。一般に発酵乳の製造では pH 5.2~5.3 で牛乳の凝固がはじまり、カゼインの等電点付近の pH 4.7 付近で発酵を終了、冷却する。PF 2 株は市販の乳酸菌 YC 380 に比べ pH の低下が遅く、発酵乳製造の場合、遅延する傾向が認められた。同様に両者の酸度はそれぞれ培養 6 時間で 0.32, 0.53, 培養 8 時間で 0.47, 1.03 となり、PF 2 株による発酵乳は酸味が弱く、ヨーグルトフレーバーも少ない製品となった。一方、PF 2 株と YC 380 を混合培養することにより pH の低下、酸度の上昇とも改善され (図 5)、プロピオン酸の風味を示す、特徴的なフレーバーを持った発酵乳の製造が可能であった。

3. 要約

北海道産の乳素材より *Propionibacterium freudenfeichii* subsp. *shermanii* の近縁種と推定されるプロピオン酸菌 PF 2 株を分離した。PF 2 株は乳酸を炭素源として良く生育することから、乳酸菌など乳糖を乳酸に変換する微生物との逐次培養、混合培養が有効と考えられる。

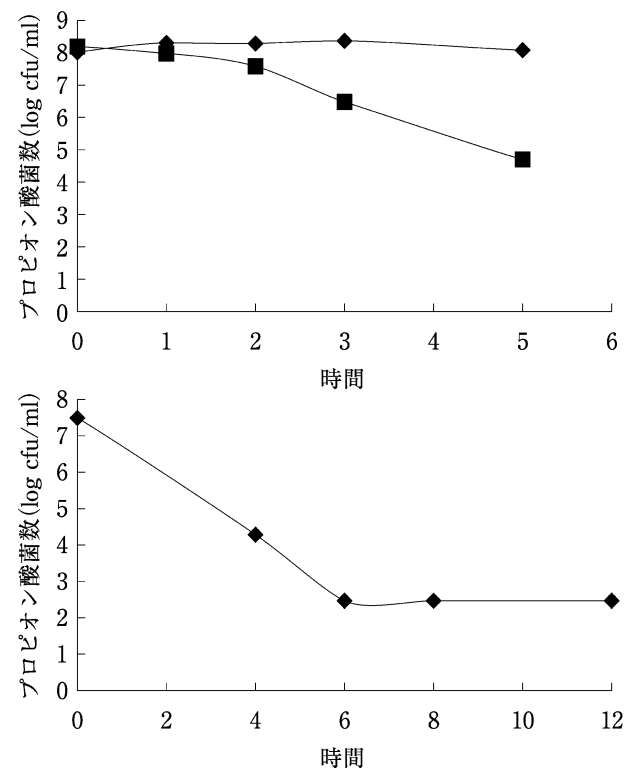


図 4 プロピオン酸菌の耐酸性

- (1) PF 2 株の人工胃液耐性
 pH 3.0 (◆), pH 2.0 (■)
 (2) PF 2 株の人工腸液耐性

また、PF 2 株はビフィズス菌増殖促進効果を示した。PF 2 株は胃酸耐性を示し人工胃液中で生存可能であったが、胆汁酸耐性は低くプロバイオティクスとしての利用には更なる検討の必要性が示された。PF 2 は乳酸菌と混合培養することで特徴ある発酵乳の製造に活用可能であることが明らかになった。

文 献

- 1) Kaneko T., Mori H., Iwata M. Meguro S., J. Dairy Sci., **77**, 393-404 (1994).
- 2) 金子勉, 野田勝彦, 酪農の化学・食品の研究, **45**, A-83 (1996).
- 3) 荒勝俊: New Food Industry, **45**, 58 (2003).
- 4) 内村奏, 岡田早苗, 「乳酸菌実験マニュアル——分離から同定まで——」小崎道雄監修, (朝倉書店, 東京)
- 5) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸: 食科工誌, **45**, 58 (1998).
- 6) Nagashima K., Shimizu T., Takesi K., Kawakami M., Yasokawa D., Nakagawa R., Okumura Y.: J.

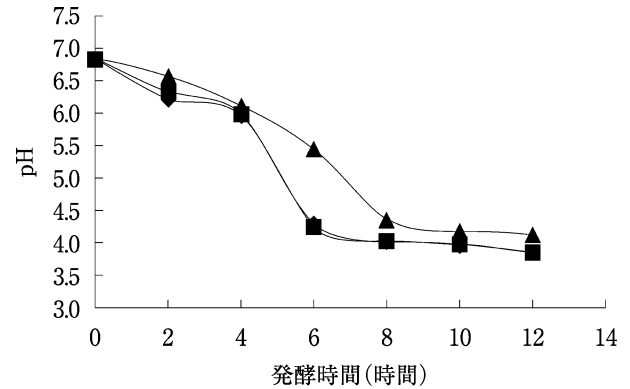


図5 試作発酵乳の pH
YC 380 単独培養(◆), PF 2 株単独培養(▲), YC 380 と PF 2 株の混合培養 (■)

- Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 115 (2000).
- 7) 「乳製品試験法・注解」日本薬学会編集, (金原書店, 東京).
- 8) Lena I. Vorobjeva, "Propionibacteria", Kluwer Academic Publishers.