

乾燥粉末乳酸菌スターターの開発 (第3報)

— ヨーグルト用乳酸菌の乾燥化 —

田村吉史・吉川修司・川上 誠

Fluidized Bed Drying of Lactic Acid Bacteria for Food Starter (Part III)

— Drying of Lactic Acid Bacteria for Yogurt Products —

Yoshifumi TAMURA, Shuji YOSHIKAWA and Makoto KAWAKAMI

Lactic acid bacteria starters are used for many fermented milk products. However, these starters are imported as freeze-dried products from Europe and the U.S., and are expensive and of limited variety. In this study, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, both frequently used in the production of dairy products, were dehydrated using a fluidized bed. The viability of the former strain after dehydration was low, regardless of sucrose concentration. However, viability of the latter strain, which proved to be higher than that of the former strain in every case, produced a maximum viability of 60 percent.

乳酸菌発酵食品を工業的規模で安定生産する上で、スターターは欠かせない。ヨーグルトやチーズなど発酵乳製品の製造には広く使用されている。しかし、スターターについていくつか問題点が上げられる。中でも最も大きい問題はスターターの価格が高いこと、供給形態・バリエーションが乏しいの2点である。現在市販されている食品用乳酸菌スターターは、凍結品あるいは凍結乾燥品である。スターターの中でも凍結乾燥品の製造は、凍結や減圧化などエネルギーを要する過程が多く、割高となる。乳酸菌スターターは一部国産のものもあるが、多くは外国からの輸入に頼っており、いずれのスターターも凍結乾燥品として供給されている。輸送距離や時間上の制約もあり、商品として複数のスターターを有する国外の企業であっても、輸出品は凍結乾燥品に限られる。

このようなことから、保管に場所を取らず、取扱いと管理が容易な低価格のスターターが望まれている。また、スターターのバリエーションを豊富にすることで、様々な特徴を持った乳製品が製造される可能性が秘められている。

本報では、ヨーグルト用乳酸菌の流動層乾燥法による乾燥化を試みたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

菌株は、乳業技術協会より購入した *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5 b (以下 *L. bulgaricus*)、および *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510 (以下 *S. thermophilus*) を用いた。

2. 供試培地

1) 寒天培地

MRS 培地：MRS broth (Difco) に寒天を 1.5% 添加した。

MRS-Whey 培地：MRS 培地よりグルコースを除き、水に替えて除タンパクしたチーズホエーを用いた。

Rogosa 培地：Difco

Rogosa-Whey 培地：Rogosa 培地よりグルコースを除き、水に替えて除タンパクしたチーズホエーを用いた。

GAM 培地：日水製薬

TPY 培地：*Bifidobacterium* 分離用培地¹⁾ に寒天を 1.5% 添加する。TPY 培地は、ポリペプトン 1.0%、ポリペプトン S 0.5%、グルコース 1.5%、酵母エキス 0.25%、ツイン 80 1.0 ml、塩酸システイン 0.05%、 K_2HPO_4 0.2%、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05%、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

O 0.025%, CaCl₂ 0.015%, FeCl₃ Trace で, pH は 6.5 である。

なお, 除タンパクしたチーズホエーは, チーズホエーを 1 N HCl を用いて pH 4.6 に調整し, 100°C, 30 分加熱してカゼインを沈殿除去し, 次に 1 N NaOH で pH 7 に調整し 100°C, 30 分加熱してホエータンパクを除去し調製した。

3) 液体培地

TPY 培地: *Bifidobacterium* 分離用培地¹⁾

pH 調製剤入り TPY 培地: pH 調製剤として炭酸カルシウムを 0.3% 添加した。

MRS 培地: MRS broth (Difco)

MRS 培地 (改): ポリペプトン S 0.5% 及びシステイン 0.05% 添加した。

3. グルコース濃度及び初発 pH の検討

使用培地: TPY 培地

グルコース添加量: 1.5, 3.0, 5.0%

初発 pH の調製: K₂HPO₄ の添加量を変化させ, pH 6.7~8.0 とした。

なお, K₂HPO₄ は, 33.3% 溶液, グルコースは 50% 溶液を調製し, 滅菌後, 培地に別途添加した。

4. 供試菌の培養

寒天培地の場合は, 37°C, 2 日間培養した。

液体培地の場合は, 37°C で静置培養した。

5. 供試菌の大量培養及び菌濃縮液の調製

供試乳酸菌は, TPY 培地を用いて, 24 時間, 37°C にてジャーファーマンター培養した。培養中は, 培養液の pH を 14% アンモニア水を用いて 6.5 に保った。

菌濃縮液は, 培養液を 8,000 rpm, 15 分間, 遠心分離により集菌し, TPY 培地 100 ml に懸濁して調製した。

6. 生菌数の測定

生菌数測定には, BCP 加プレートカウント培地を用いた。

7. 流動層乾燥

1) 流動層乾燥の方法及び条件

第 1 報に準じた²⁾。

基材としてスキムミルク (雪印乳業) を用いた。

2) 供試乳酸菌の乾燥化における保護剤 (シュクロース) 濃度の影響

流動層乾燥における保護剤の濃度が乳酸菌の生存率に与える影響を知るために, その濃度を 0~40% まで変化させて生残率を計測した。

生残率の計算方法は, 第 1 報に準じた²⁾。

8. 電子顕微鏡観察

流動層乾燥によって作成された試料を, 定法に従いイオンスパッタリング後, 走査型電子顕微鏡により行った。

実験結果および考察

1) 生育に適した培地の検討

乾燥菌体を作成する上で, 大量の菌が必要である。このため液体培地で大量培養するが, それに先立ち培養に適した培地の選択が必要となる。このため, 寒天培養で培地の種類を検討した。供試菌株を供試培地に塗抹し, 37°C, 2 日間培養して最も良好な生育を示す培地を選択した。

L. bulgaricus を用いた場合, Rogosa, Rogosa-Whey, GAM の各培地にはコロニーの形成がみられなかった。MRS, MRS-Whey 培地ではコロニーの形成はみられたが, TPY 培地と比較して少なかった。TPY 培地では, 培地上一面にコロニーが形成され, 良好な生育がみられた。

S. thermophilus を用いた場合は, Rogosa, Rogosa-Whey の各培地にはコロニーの形成がみられなかった。MRS, MRS-Whey, GAM の各培地ではコロニーが形成され生育は良好であった。TPY 培地でも, 同様にコロニーが形成され良好な生育がみられた。

したがって, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* のいずれについても, TPY 培地を用いた場合に生育が良好であることが判明した。

MRS 培地は乳酸菌の培養に良好な培地とされているが, 供試菌株の生育は TPY 培地に比べかなり劣っていた (データ略)。この理由を推測すると, TPY 培地に含まれ MRS 培地に含まれていない成分は, ポリペプトン S とシステインであり, いずれも *L. bulgaricus* の生育を促進するとされている³⁾。MRS 培地にこれらを添加して培養し, 生育が促進されるか検討する必要があると考えられた。TPY 培地は *Bifidobacterium* の分離にしばしば使用される培地であり, 組成は ATCC カタログの 1006 培地と酷似しており⁴⁾, *Lactobacillus* 層はこの 1006 培地でよく生育するとの文献もある³⁾。

2) 乳酸菌の液体培養

寒天培地での検討の結果, 最も生育が良好だった TPY 培地の組成で, 乳酸菌の液体培養の条件を検討した。

L. bulgaricus の菌数および pH の変化を図 1 に示した。培養 1 日で急激な菌数の増加があり, その後徐々に低下した。

TPY 培地中での増殖は急激であり, 培養 1 日で生菌

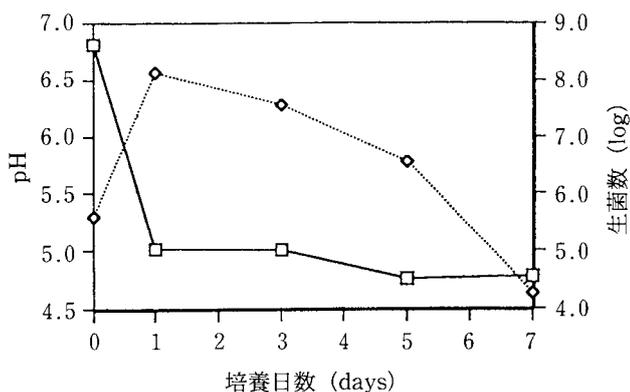


図1 TPY 培地による *L.bulgaricus* の培養中の生菌数と培地 pH の変化
 —□— pH
 —◇— 生菌数 (log)

数は最大値を示した。1日以上培養を継続すると菌数は低下した。さらに菌数を上昇させるには培地を検討する必要がある。pH は急激に5付近まで低下するが、その後の低下は緩やかであった。炭酸カルシウムを添加しない場合、1日で pH 5 以下となり、2日後には4.3程度まで低下することが予備試験で示されており(データ略)、炭酸カルシウムが pH 低下を抑え、菌数の急激な減少を抑えていると考えられた。菌数を上昇させる培地の検討として、MRS 培地に、TPY 培地と同量のポリペプトン S とシステインを添加して培養した結果を図2に示した。

ポリペプト S とシステインを添加した MRS 培地では、培養1日目に急激な菌数の減少が見られ、その後急激に増加した。これは供試菌株が、この培地組成に対して適応するのに時間がかかっていることを示している。この場合でも最大菌数は、TPY 培地とほとんど変わらなかった。このため、短時間で多くの菌体を回収できる TPY 培地の方が有効であった。

グルコース濃度を変化させたときの、培地 pH6.7 の場合の生菌数および pH 変化を図3に示した。グルコース濃度を増やしても生育は促進されず、5%では生育が抑制された。pH の低下についても、5%では緩やかであった。ポリペプトン S とシステインを添加した MRS 培地による培養、グルコース高濃度による培養の結果から、供試菌株の *L.bulgaricus* は、高浸透圧下では生育が阻害される可能性が示唆された。また、初発 pH は7を越えると抑制され、7.5~8とした場合、*L.bulgaricus* は生育しなかった(データ略)。

S.thermophilus は、炭酸カルシウム無添加の TPY 培地でも良好な生育を示し、pH が低下しても菌数の低下

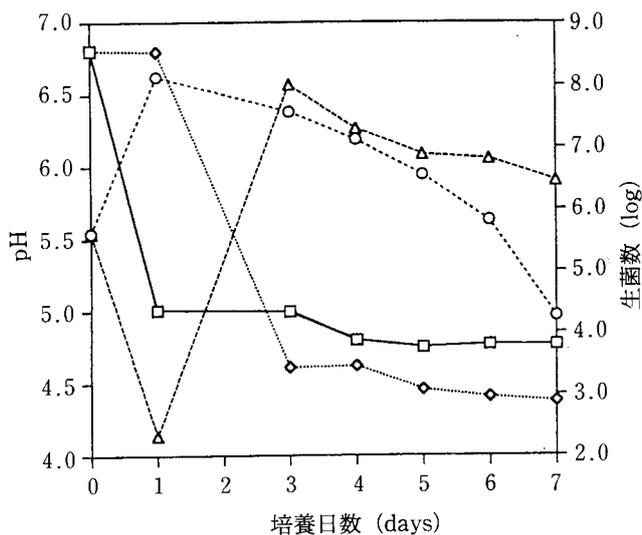


図2 *L.bulgaricus* のポリペプトン S 及びシステインを添加した MRS 培地及び TPY 培地を用いて培養した場合の生菌数と pH の変化

pH
 —□— TPY 培地
 —◇— ポリペプトン S, システイン添加 MRS 培地
 生菌数 (log)
 —○— TPY 培地
 —△— ポリペプトン S, システイン添加 MRS 培地

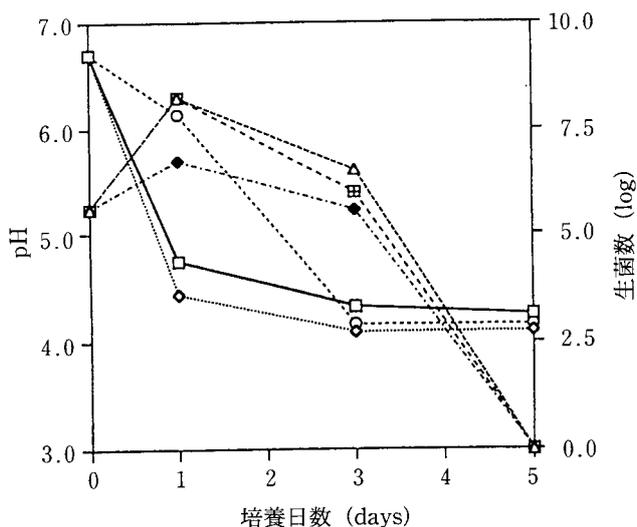


図3 *L.bulgaricus* の TPY 培地においてグルコース濃度を変化させた場合の生菌数と pH の変化

pH
 —□— グルコース 1.5%
 —◇— グルコース 3.0%
 —○— グルコース 5.0%
 生菌数 (log)
 —△— グルコース 1.5%
 —田— グルコース 3.0%
 —◆— グルコース 5.0%

は、*L.bulgaricus* の場合と比べ穏やかであった（データ略）。この結果から、両供試菌の大量培養には、TPY 培地を使用することとした。

3) 流動層乾燥における保護剤の効果

L.bulgaricus の生残率は、保護剤として用いたシュクロース濃度に関わらず最高でも 2.5% と非常に低く、第 1 報で報告した *L.plantarum* とは全く異なるパターンを示した²⁾ (図 4)。乾燥粉末の水分含量は、シュクロース濃度に関わらず 5~6% で一定であった。今回の試験から、本菌株は *L.plantarum* に比較して乾燥に弱い事が示

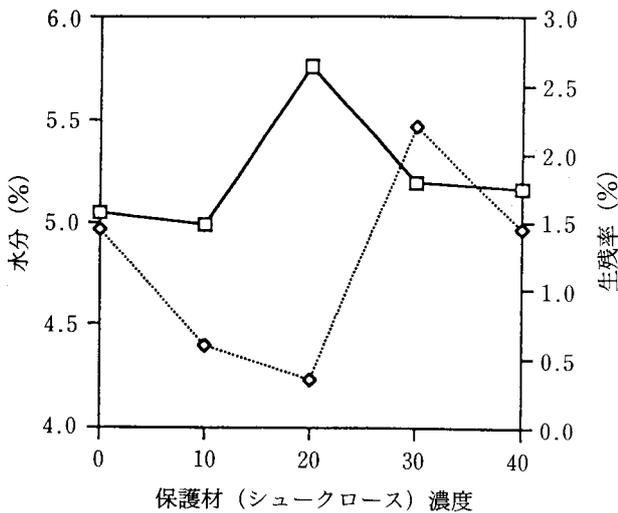


図 4 *L.bulgaricus* の生残率と水分含量に於ける保護剤 (シュクロース) 濃度の影響
 —□— 水分 (%)
 —◇— 生残率 (%)

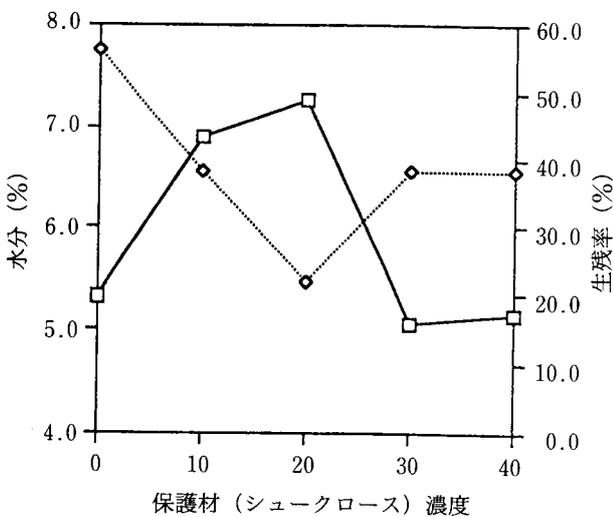


図 5 *S.thermophilus* の生残率と水分含量に於ける保護剤 (シュクロース) 濃度の影響
 —□— 水分 (%)
 —◇— 生残率 (%)

された。供試菌株と保護剤の種類と濃度、乾燥条件の検討などが課題となった。

S.thermophilus を乾燥した場合、生残率は保護剤無添加の場合に 60% 弱と、高い値を示した。むしろ保護剤であるシュクロースを添加すると生残率は低下した。しかし、シュクロース濃度による差はほとんどなく、20~40% とほぼ一定である (図 5)。この傾向はこれまで乾燥に供してきたいずれの菌株の場合^{2),5)}とも異なり、菌株により乾燥耐性や至適乾燥条件が異なることを示している。今後は保護材の種類や乾燥条件を変え、至適乾燥条件の検討が課題となった。

流動層乾燥において作製した乾燥菌体 (基剤はスキムミルク) の電子顕微鏡写真を図 6, 7 に示した。桿菌である *L.bulgaricus* (図 6) 及び球菌である *S.thermophilus*

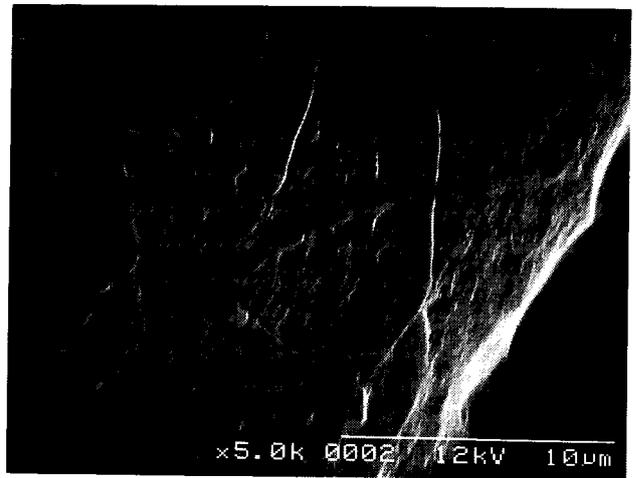


図 6 乾燥菌体の電子顕微鏡写真 (*L.bulgaricus*)
 スキムミルク表面にメロンのネット状に桿菌である *L.bulgaricus* が付着している様子が示されている

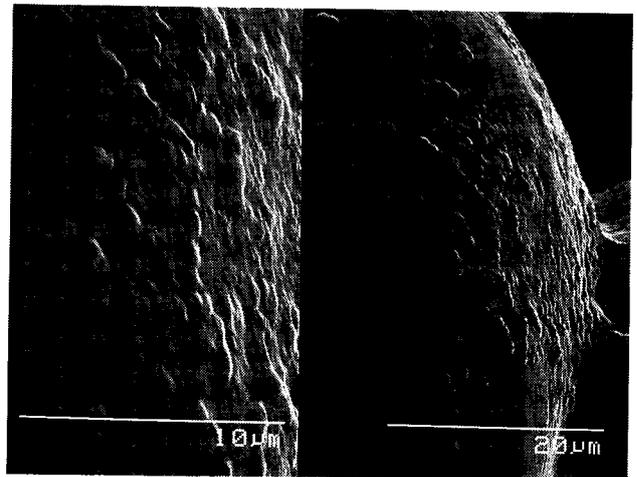


図 7 乾燥菌体の電子顕微鏡写真 (*S.thermophilus*)
 スキムミルク表面に球菌である *S.thermophilus* が粒状に点在して付着している様子が示されている

(図7)がスキムミルク上に付着している様子が示されている。

要 約

ヨーグルト用乳酸菌である *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と *S.salivarius* subsp. *thermophilus* の乾燥化を試みた。増殖培地は双方ともに TPY 培地が適していた。*L.bulgaricus* を流動層乾燥させた場合は、保護材のシュクロース濃度に関わらず生残率が低かった。*S.thermophilus* を流動層乾燥させた場合は、保護材無添加の場合に 60%と最も生残率が高かった。

文 献

1) BIAVATI, B., SGORBATI, B., and SCARDOVI, V.:

The Prokaryotes, 2ed ed., 1, BALOWS. A., TRUPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K.-H., p.816 (1991)

- 2) 吉川ら：乾燥粉末乳酸菌スターターの開発 (第1報)
- 3) HAMMES, W.P., WEISS, N. and HOLZAPFEL, W.: The Prokaryotes, 2nd ed., 2, BALOWS. A., TRUPER, H.G., DWORKIN, M., HARDER, W., and SCHLEIFER, K.-H., p.1535 (1991)
- 4) COTE, R.: American Type Culture Collection CATALOGUE OF BACTERIA AND PHAGES, 17th ed., GHERNA, R., PIENTA, P. p. 328 (1989)
- 5) 吉川ら：乾燥粉末乳酸菌スターターの開発 (第2報)