

流動層造粒装置による乾燥菌体の製造技術と性能評価

能登裕子, 奥村幸広

Production Technology and Performance Evaluation of Dried Cells Using Fluidized Bed Granulation Equipment

Hiroko Noto and Yukihiro Okumura

In this study, we tried instituting a product standard for the practical use of dried cells and establishing a method of manufacturing to meet the product standard using *Lactobacillus paracasei* and *Propionibacterium freudenreichii* PF2 dried cells with fluidized bed granulation. The performance observed from the use of the dried bacterial cells as starters was found to be comparable to that of the controls.

KEY-WORDS : Fluidized bed granulation, Dried bacterial cells, Ripened cheese

キーワード : 乾燥菌体, 熟成型チーズ, 流動層造粒

北海道では、ヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品が数多く生産されている。ほとんどの発酵乳製品の製造では、乳酸菌を乾燥粉末化した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。

当センターでは独自に分離した発酵乳製品用菌株を道内の乳製品製造企業に凍結菌体や菌液などの状態で分与している。しかしながら、これら分与菌株をスターターとして使うには事前の増殖培養が必須であり、事前処理が不要で取扱いが容易な乾燥菌体での供給が求められている。

一般に乾燥菌体は凍結乾燥法¹⁾で製造されるが、「コストが高い」、「乾燥菌体の分散性が悪い」などの欠点があることから、当センターでは「流動層造粒」による乾燥菌体の製造について検討を行ってきた^{2)~8)}。流動層造粒により調製した乾燥菌体は顆粒状で、流動性や分散性に優れている反面、菌株の種類によって乾燥菌体中での菌の生残率が異なること、保存性について確認されていないなどの問題が残されている。また、実用化には、流動性等の粉体特性に基づく製品規格の設定と実生産規模に合致し

た製造技術を確認することが必要である。

そこで、本研究では、当センター保有の乳酸菌とプロピオン酸菌について、実用化に向けた乾燥菌体の製品規格の設定とその規格を満たす乾燥菌体を流動層造粒によって製造する方法の検討を行った。

1. 実験方法

(1) 供試菌株と培養試験

供試菌株は、当センターで保有する *Lactobacillus paracasei* (以下、後期熟成乳酸菌) を使用した。培地は、MRS培地 (Difco), GAM培地 (日水製薬), M17培地 (Oxoid), GYP培地 (グルコース 1%, 酵母エキス 1%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.2%, 酢酸ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.02%, 硫酸マンガン 0.001%, 硫酸鉄 0.001%, 食塩 0.001%, Tween80 0.05%, pH無調整) を使用した。培地 100mL に菌培養液 1mL を接種し 35°C で振とう培養 (100rpm) した。培養期間における当該菌株の増殖は、培養液の濁度 (OD600nm) により測定した。

事業名：経常研究

課題名：乾燥微生物スターターの実用化技術の開発

また、当センターで保有する *Propionibacterium freudenreichii* PF2 (以下、プロピオン酸菌) を供試菌株として使用したが、培養試験、流動層造粒試験および保存試験は筆者らの報告⁸⁾ のとおり行った。

(2) 流動層造粒試験と保存試験

後期熟成乳酸菌は、MRS培地で35°Cで24時間培養し、遠心分離(7,500rpm, 10分)により集菌した。次に、集菌した菌体を滅菌生理食塩水で洗浄後、保護材(20%スクロース水溶液, 20%グルコース水溶液, 20%ラクトース水溶液, 20%マルトース水溶液) 40mLに懸濁し、流動層造粒装置への投入菌液を調製した。

造粒装置として、FD-MP-01D型(株)パウレック社製)

を使用し、スキムミルク500gを基材として60°C, 風量0.4~0.7m³/minの温風で流動化させ、調製した投入菌液を流量8mL/minで噴霧して造粒し、乾燥菌体を調製した。乾燥菌体の生菌数は、BCP寒天培地(日水製薬)にて測定した。保存試験は、筆者らの報告⁸⁾ のとおり37°C, 2週間保存し行った。

(3) 製品規格設定のための流動層造粒試験

図1に今回の流動層造粒試験の造粒工程を示した。製品規格を設定するため、暖気運転、流動層造粒、乾燥工程の運転条件を検討した。造粒条件は、(2)流動層造粒試験と同様にし、菌液を含まない20%スクロース水溶液40mLを流量8mL/minで噴霧して造粒した。粉体特性は、粉体

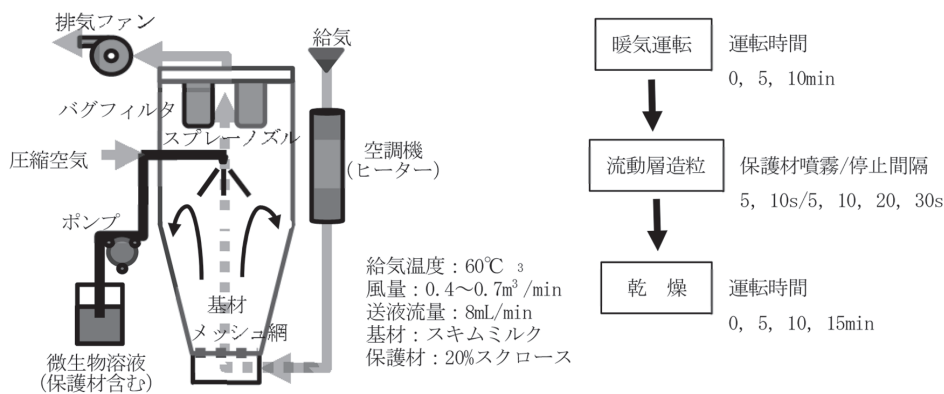


図1 転動流動造粒コーティング装置による造粒工程

表1 流動層造粒した乾燥菌体の粉体特性と製品規格

	製品規格	基材 スキムミルク	造粒乾燥菌体	
			プロピオン酸菌 保護材: 20%スクロース	後期熟成乳酸菌 保護材: 20%グルコース
平均径 (μm)	80.0以上	75.0	98.1	83.3
安息角 (度)		41.3	43.0	45.3
崩潰角 (度)		25.0	42.3	32.3
差角 (度)		16.3	0.7	13.0
ゆるみかさ密度 (g/cm ³)		0.626	0.569	0.590
固めかさ密度 (g/cm ³)		0.848	0.712	0.788
圧縮度 (%)		26.2	20.1	25.2
分散度 (%)	35.0未満	35.0	22.7	18.0
スパチュラ角 (度)		51.5	56.3	60.3
均一度 (-)		2.7	1.9	2.1
流動性指数		70.5	74.5	68
噴流性指数		81	53	65

生菌数: 1×10^9 CFU/g以上

流動性指数: 粉体の流動性を表す指数で数値が大きいほど流動性が良いことを示す。

90~100最も良好(A), 80~89良好(B), 70~79かなり良好(C), 60~69普通(D), 40~59あまり良くない(E), 20~39不良(F), 0~19非常に悪い(G)

噴流性指数: 粉体の舞い上がりやすさを示す指数で数値が大きいほど舞い上がりやすいことを示す。

80~100非常に強い(A), 60~79かなり強い(B), 40~59傾向がある(C), 25~39するかも知れない(D), 0~24なし(E)

特性評価装置, パウダテスタPT-E (ホソカワミクロン株) を用いて測定した。粒度分布測定は, 粒度分布測定装置, LS13 320 (ベックマンコールター株) を用いて測定した。

(4) チーズの試作

表2の条件で造粒した乾燥菌体を用い, 後期熟成乳酸菌は造粒直後および冷凍(-30°C)で6ヶ月間保存した乾燥菌体を使用し, 原料乳20kgを用いてゴーダタイプのチーズの試作を行った。乾燥菌体の性能は, チーズ中の菌数および遊離アミノ酸量を測定して評価した。乾燥菌体は, 10%還元脱脂粉乳に乾燥菌体を1%添加し24時間培養後 2×10^7 CFU/mLになるように原料乳へ添加し, 常法によりゴーダタイプのチーズ試作を行った。性能を評価するにあたり, 後期熟成乳酸菌はMRS培地35°C 24時間培養したものを対照とした。

プロピオン酸菌は, 表2の条件で造粒した乾燥菌体を用いガスホール形成型(以下エメンタールタイプ)のチーズを協力機関にて原料乳200kgで試作し, チーズアイの形成状態およびチーズ中の菌数や香气成分測定により乾燥菌体の性能を評価した。エメンタールタイプのチーズの試作は常法により行った。性能を評価するにあたり, 市販されている乾燥菌体を対照とした。

(5) チーズ中の菌数および遊離アミノ酸測定

ゴーダタイプのチーズの菌数は, LBS寒天培地(DIFCO)⁹⁾で培養して測定した。遊離アミノ酸は, 試料チーズ2gに温湯(60°C)18mL加え, ホモジナイズし, 沈殿をろ別した。ろ液と等量の2%(w/v)スルホサリチル酸水溶液を加えて混合し, 4°Cで30分間静置後, 遠心分離(3,000rpm, 5分)し, 得られた上清を試料としてアミノ酸自動分析計(L-8900形, 株日立ハイテクノロジーズ)で遊離アミノ酸の測定を行った。

エメンタールタイプのチーズ中の菌数測定は, NaLa

寒天培地¹⁰⁾を用いて測定した。

2. 実験結果および考察

(1) 流動層造粒による乾燥菌体造粒条件の検討

後期熟成乳酸菌について, 35°Cでの生育培地の違いによるOD(600nm)値を測定したところ, MRS培地35°C, 24時間でOD(600nm)値が最大となり, 菌体を増殖させる条件として最適であった(データ省略)。

図2に保護材を変えた時の流動層造粒直後および37°C 2週間保存後の乾燥菌体の生菌数を示した。20%スクロースを保護材とした時の造粒直後の生菌数は 10^9 CFU/gオーダー, 2週間保存後の生菌数が 10^5 CFU/g以下となった。保護材の種類による造粒直後の生菌数に差はなく 10^9 CFU/gオーダーであった。グルコース以外の保護材では, 2週間保存後の生菌数が 10^6 CFU/g以下であったが, グルコースを保護材とすることで, 10^9 CFU/gオーダーの生菌数が得られた。

さらに製造する乾燥菌体の生菌数を多くするため, 造粒時の投入菌量を変えて流動層造粒試験を実施したところ, 造粒直後の生菌数は, 投入菌量の増加とともに増加する傾向が見られたが, 2週間保存後の生菌数は, 4×10^{10} CFU/mL以上の投入菌量を入れても 2×10^9 CFU/gとなったため, 投入菌量は 4×10^{10} CFU/mLとした(データ省略)。

筆者ら⁸⁾は, 培養時に水分活性を低下させた培地で培養することで, 保存性が改善することを報告している。しかし, 本報告で使用した供試菌株(後期熟成乳酸菌)では, 水分活性を低下させた培地で培養しても保存性は改善しなかったため, 保護材の検討を行った。Lindersら¹¹⁾は流動層乾燥法により, 2糖類のスクロース, マルトースおよびラクトースを保護材として使用し, 糖の種類により乳酸菌の活性に相違があることを報告している。

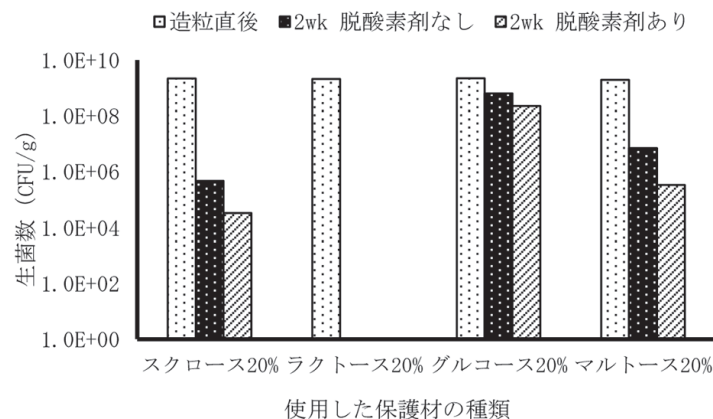


図2 保護材を変えた時の乾燥菌体の生菌数

表2 最適な製造条件

	プロピオン酸菌	後期熟成乳酸菌
基材	スキムミルク	
給気温度	60°C	
風量	0.4-0.6m ³ /min	
暖気運転時間	5 min	
保護材濃度	20%スクロース	20%グルコース
流量	8 mL/min	
噴霧/停止 時間	10s/20s	
培養条件	GYP+ 3%食塩添加培地 35°C 23h培養	MRS培地 35°C 24h培養
投入菌量	1.6×10 ¹⁰ CFU/mL	4×10 ¹⁰ CFU/mL
乾燥時間	10min	

本報告においても使用する糖により保存後の生菌数に違いがあることが確認されており（図2），使用する菌株により保護材の種類を変える必要があることが示された。

(2) 製品規格設定のための造粒条件の検討

造粒条件を検討するために、暖気運転時間と基材の乾燥時間を変えて流動層造粒したスキムミルクの粉体特性を調べた（表1）。基材となるスキムミルクは流動性の良い粉体であるが、噴流性は悪いため改善する必要があることが明らかになった（表1）。噴流性を改善するための運転条件は、暖気運転時間5 min、乾燥運転時間10minであり、凝集体の形成や乾燥後の固着がなく外観も良好であった。また、微生物溶液の噴霧時間を10s、停止時間を20sとした間欠運転により良好な粉体特性が得られることが示唆された。暖気/乾燥運転時間と造粒物の平均径は、乾燥時間が増加しても、粒子径の変化は認められず83 μm程度を示した。（データ省略）

表1にこれまでに設定した造粒条件で造粒した乾燥菌体の粉体特性を調べた結果を示した。

Carr¹²⁾の流動性指数表および噴流性指数表より、基材であるスキムミルクの流動性が良好であることから噴流性を改善する条件を検討した。造粒条件、菌株の種類に関わらず、安息角は、基材のスキムミルクと遜色ないことがわかった。さらに、平均径および崩潰角が大きくなり、差角（安息角と崩潰角の差）、分散度および均一度が小さくなる傾向が見られた。スキムミルクの噴流性指数は81（A区分）であるが、造粒操作により、噴流性指数は65（B区分）、53（C区分）に改善された。製品規格の設定値として、噴流性指数を用いると、崩潰角、差角、分散度を測定することとなる。分散度は、単独で簡易に測定が可能な項目であることから、品質管理上の指標として扱いやすいた

め、製品規格とし、分散度35%未満を規格として設定した。生菌数の規格については、チーズ用のスター乳酸菌として添加する場合、原料乳に対し10⁶-10⁷CFU/mLオーダーで添加する必要があるため、1×10⁹CFU/g以上が必要となることから規格値が設定された。これらの結果より、表2に示す条件にて、生菌数1×10⁹CFU/g以上、平均径80 μm以上、分散度35%未満となる乾燥菌体を製造することが可能となった。

(3) 乾燥菌体の性能評価

チーズ製造時の乾燥菌体の添加量は、スター乳酸菌と同量の場合とスター乳酸菌の1/10量の場合が想定されるため、使用方法について検討を行った。スター乳酸菌と同量添加の場合、乾燥菌体を原料乳に直接添加すると添加量が非常に多くなる。そこで、10%還元脱脂乳100mLに乾燥菌体を1 g添加することで、24時間後には10⁹CFU/mLオーダーまで菌数が増殖することが分かった（データ省略）。この結果より試作前日に10%還元脱脂乳に乾燥菌体を1%添加し培養することで、スター乳酸菌と同量まで添加することが可能となった。また、乾燥菌体の添加量が、スター乳酸菌の1/10量の場合は、本研究の中で造粒した乾燥菌体は1×10⁹CFU/g以上の生菌数があることから、直接、必要量添加することが可能であった。

後期熟成乳酸菌のコントロール（従来の使用方法）および造粒直後の乾燥菌体を用いたチーズの熟成期間中の菌数および遊離アミノ酸量を調べた。乾燥菌体の菌数は、コントロールと同様に推移していることが確認できた。チーズ熟成中の遊離アミノ酸量も、コントロールと同様に推移していた（データ省略）。以上の結果から、造粒直後の乾燥菌体の性能は、コントロールと同等であるこ

とが分かった。

後期熟成乳酸菌のコントロール（従来の使用方法）および長期保存後の乾燥菌体を用いたチーズの熟成期間中の菌数および遊離アミノ酸量を調べたところ、長期保存後の乾燥菌体の性能もコントロールと同等であることが確認できた（データ省略）。

協力機関にて市販の乾燥菌体を使用したチーズと本研究で製造した乾燥菌体を使用したチーズのチーズアイの形成状態は遜色ないことが確認できた。添加したプロピオン酸菌についてもチーズ中で増殖し、香気成分についても市販品と遜色ないことが確認された。使用方法についても市販の乾燥菌体と遜色ない使い勝手であることから乾燥菌体の性能に問題がないことが確認できた（データ省略）。

本報告では 10^9 CFU/g オーダーの高い生菌数を維持する乾燥スターターの製造方法を確立したが、実用化に向けた課題として、実生産規模のスケールに合わせた製造条件の検討が必要である。

3. 要約

流動層造粒による乾燥菌体の製造方法は、菌株により培養条件、保護材の種類、投入菌量が異なったが、その他の製造条件（基材、給気温度、風量、菌液投入流量、乾燥時間）は同じであった。製品規格は、粉体特性の結果およびチーズ用スターター乳酸菌としての必要菌数から、平均径 $80\mu\text{m}$ 以上、分散度35%未満、生菌数 1×10^9 CFU/g以上に設定し、この製品規格を満たす乾燥菌体の製造方法を確立した。

文 献

- 1) Chalat,S., Ulrich,K., Petra,F. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter Cultures. *Biotechnol.Prog.* **23**, 302-315.
- 2) 吉川修司, 浅野行蔵, 富永一哉 (1996). 乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発 (第1報). 食品加工研究センター研究報告, 食品加工研究センター, 65-69.
- 3) 浅野行蔵, 吉川修司, 富永一哉 (1996). 乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発 (第2報). 食品加工研究センター研究報告, 食品加工研究センター, 71-75.
- 4) 田村吉史, 吉川修司, 川上誠 (1996). 乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発 (第3報). 食品加工研究センター研究報告, 食品加工研究センター, 77-81.
- 5) 吉川修司, 浅野行蔵, 田村吉史, 富永一哉, 下林義昭 (2002). 味噌用乳酸菌乾燥スターターの開発. *J.Brew. Soc.Japan*, **97**, 4, 307-313.
- 6) 山田加一郎, 中野敦博 (2012). 乳酸菌等分離株の培養特性とスターター化調製技術の開発. 平成24年度事業報告平成25年度事業計画, 食品加工研究センター, 26-27.
- 7) 山田加一郎, 八十川大輔 (2013). 流動層造粒乾燥を用いた有用微生物の粉末化に関する研究. 平成25年度事業報告平成26年度事業計画, 食品加工研究センター, 6-7.
- 8) 能登裕子, 奥村幸広, 山田加一郎 (2017). 乳酸菌 HOKKAIDO株およびプロピオン酸菌の流動層造粒法による乾燥菌体の調製. 食品加工研究センター研究報告, 食品加工研究センター, 33-36.
- 9) 木下英樹, 井本瞬, 須田義人, 石田光晴 (2011). MRS寒天培地と変法LBS寒天培地における乳酸菌の選択的単離能の比較. *Milk Science*, **60**, 3, 171-176.
- 10) N.Tharmaraj and N.P.Shah (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *J.Dairy Sci*, **86**, 2288-2296.
- 11) L.Linders, G.DeJong, G.Meerdink, K. Van'tRiet (1995). Personalcommunication.
- 12) R.L.Carr,Jr (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chem.Eng.NewYork*, **18**, 163-168.