

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

能登裕子, 奥村幸広, 山田加一朗

Preparation of Dried Cells of *Lactobacillus plantarum* Hokkaido and Propionic Acid Bacteria Using Fluidized Bed Granulation

Hiroko Noto, Yukihiro Okumura
and Kaichiro Yamada

In this study, the processing condition of granular dried bacterial cells with high preservative quality and practically maximized viable cell counts were determined using *Lactobacillus plantarum* Hokkaido (a Hokkaido strain) and *Propionibacterium freudenreichii* PF-2. The performance of dried bacterial cells as starters was found to be comparable to that of the controls.

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。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、北海道独自の発酵乳製品用スターターが望まれている。食品加工研究センターでは独自に分離した有用微生物株を、道内の乳製品製造企業などからの要望により凍結菌体や菌液などの状態で分与している。これら菌株をスターターとして使うには培養設備などを要することから、取扱いが容易な乾燥菌体スターターでの供給が求められている。通常、乾燥菌体の製造には凍結乾燥法が利用される¹⁾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。そこで、当センターではこれまで、乾燥菌体製造への「流動層造粒」の利用について検討を行ってきた^{2)~6)}。この方法により調製した乾燥菌体は、顆粒状であるため流動性や分散性に優れているが、菌株により生残率の変動があり、保存性、実用性などを確認しなければならない。

そこで、本研究では、当センターが保有し、多くの企業に利用が広がっている乳酸菌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条件について検討を行った。

1. 実験方法

(1) 供試菌株および培養試験

供試菌株として、当センターで保有する

Lactobacillus plantarum HOKKAIDO (以下 HOKKAIDO 株), *Propionibacterium freudenreichii* PF2 (以下プロピオン酸菌) を使用した。培地として、HOKKAIDO株は 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、培地 100mL に菌培養液 1 mL を接種し 30℃ で振とう培養 (100rpm) した。プロピオン酸菌は、MRS 培地, GAM 培地, GYP 培地, SCD 培地 (日水製薬) を使用し、HOKKAIDO 株と同様に 35℃ で振とう培養した。培養期間における当該菌株の増殖は、培養液の濁度 (OD 600nm) により測定した。

(2) 水分活性調製培地による培養試験

水分活性調製培地として、MRS および GYP 培地に食塩を 0 ~ 20% 添加したものを使用した。(1) と同様に供試菌株を培養し、水分活性の違いにおける当該菌株の増殖は、培養液の濁度 (OD 600nm) により測定した。

(3) 流動層造粒試験

HOKKAIDO 株は、MRS 培地および食塩添加 MRS 培地で 30℃ 25 時間培養し、5 000rpm、10 分遠心分離により集菌した。次に、集菌した菌体を滅菌生理食塩水で洗浄後、40mL の保護剤 (20% スクロース水溶液) に懸濁し、投入菌液を調製した。プロピオン酸菌は、GYP 培地及び食塩添加 GYP 培地で 35℃、23 時間培養し、7 500rpm、10 分遠心分離し、HOKKAIDO 株と同様に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、500g のスキムミルクを基材と

表 1 乾燥菌体の調製条件

項目	HOKKAIDO 株	プロピオン酸菌
培養条件		
培地	MRS 培地	GYP 培地
食塩濃度	3 %	3 %
温度・時間	30℃・25 時間	35℃・23 時間
造粒条件		
保護材濃度	20% スクロース	20% スクロース
基材	スキムミルク	スキムミルク
給気温度	60℃	60℃
風量	0.4-0.9m ³ /min	0.4-0.6m ³ /min
流量	8 mL/min	8 mL/min
投入菌量	1.3×10 ¹⁰ CFU/mL	1.6×10 ¹⁰ CFU/mL

事業名：経常研究

課題名：流動層造粒法を用いた有用微生物スターターの
顆粒化技術に関する研究

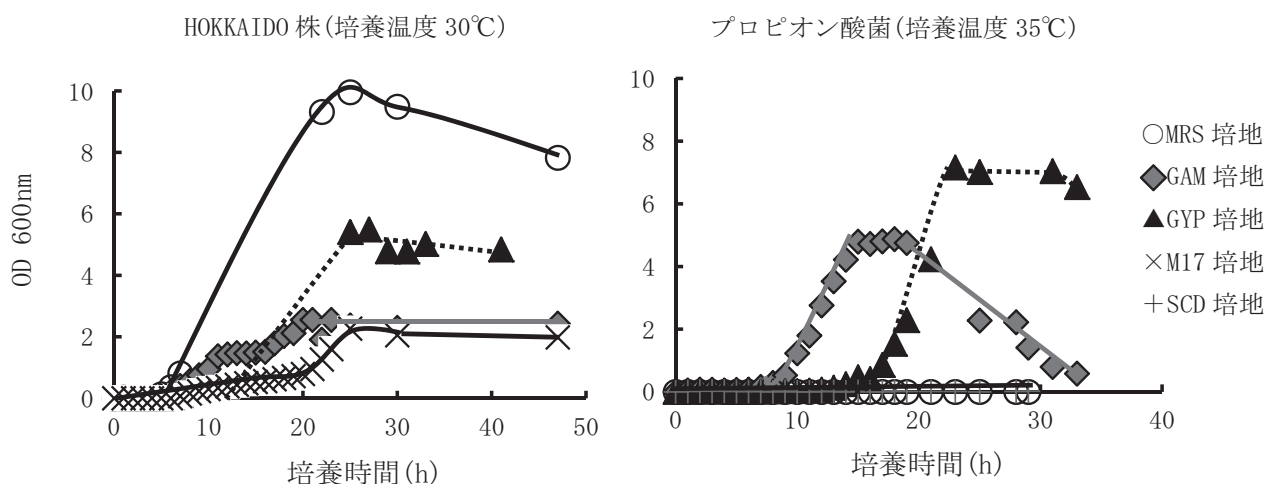


図1 生育培地の検討

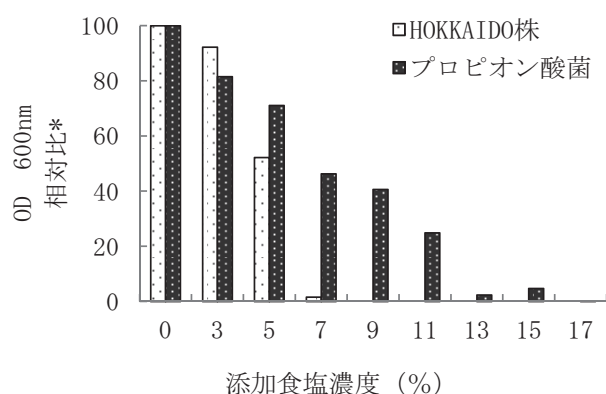


図2 食塩添加培地におけるOD相対比

培養条件はHOKKAIDO株では30℃、25時間、MRS培地、プロピオン酸菌では35℃、23時間、GYP培地

$$*OD600nm\text{相対比} = \frac{\text{食塩添加培養時のOD600nm}}{\text{食塩無添加培養時のOD600nm}} \times 100$$

表2 流動層造粒後の生菌数

投入菌量* (CFU/mL)	食塩添加 濃度	生菌数 (CFU/g)	
		HOKKAIDO株	プロピオン酸菌
$2 \sim 6 \times 10^9$	0 %	5.1E+08	5.1E+08
	3 %	2.5E+08	2.0E+08
	5 %	2.2E+08	1.7E+08
$1 \sim 2 \times 10^{10}$	0 %	1.3E+09	2.9E+09
	3 %	9.6E+08	2.5E+09
	5 %	6.1E+08	1.5E+09

*培地：MRS (HOKKAIDO株), GYP (プロピオン酸菌)

して60℃、風量0.4-0.9m³/minの温風で流動させ、調製した投入菌液を8mL/minの流量で噴霧して造粒し、乾燥菌体とした。乾燥菌体の生菌数は、HOKKAIDO株はMRS寒天培地、プロピオン酸菌はGYP寒天培地にて測定した。

(4) 保存試験

流動層造粒により調製した乾燥菌体を、酸素透過および非透過の容器に充填し、37℃で2週間の保存試験を行い、保存後の生菌数を測定した。

(5) 乾燥菌体の乳製品への利用試験

乾燥菌体の乳製品への利用試験は、HOKKAIDO株は、ヨーグルト添加後の生菌数の保持、プロピオン酸菌は、ガスホール形成型（以下エメンタールタイプ）のチーズを試作し、チーズアイの形成状態により評価した。HOKKAIDO株は、表1の条件で調製した乾燥菌体を用いて、 2×10^7 CFU/mLとなるようにヨーグルトへ添加し、市販ヨーグルトの賞味期限である14日目までの生菌数を測定した。プロピオン酸菌では常法によりエメンタールタイプのチーズ試作を行った。性能を評価するにあたり、HOKKAIDO株は、MRS培地30℃、25時間培養したもの、プロピオン酸菌は、GYP培地で35℃、23時間培養したものをそれぞれ対照とした。

2. 実験結果および考察

(1) 流動層造粒による乾燥菌体の調製条件

HOKKAIDO株ではMRS培地30℃、25時間、プロピオン酸菌ではGYP培地35℃、23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(図1)。次にEdwinら⁷⁾は、乳酸菌の培養時に水分活性を低下させ、ストレスを与えることが乾燥後、生

表3 37℃ 2週間保存後の生菌数

食塩 添加 濃度	生菌数 (CFU/g)					
	造粒直後		2週間保存後			
			酸素あり		酸素なし	
	HOKKAIDO株	プロピオン酸菌	HOKKAIDO株	プロピオン酸菌	HOKKAIDO株	プロピオン酸菌
0 %	1.3E+09	2.9E+09	9.4E+08	1.2E+09	7.7E+08	7.1E+08
3 %	9.6E+08	2.5E+09	9.6E+08	1.7E+09	9.6E+08	1.4E+09
5 %	6.1E+08	1.5E+09	5.4E+08	9.5E+08	5.1E+08	6.9E+08

表4 ヨーグルト添加後の生菌数 (HOKKAIDO株)

試験区	生菌数 (CFU/mL)			
	添加直後	3日目	7日目	14日目
菌液 (対照)	2.4E+07	2.2E+07	3.7E+07	2.5E+07
乾燥菌体	2.1E+07	2.5E+07	3.6E+07	2.2E+07

残率を向上させることを報告していることから, MRS, GYP各培地に食塩を添加し, 水分活性を低下させた培地での生育を検討した. HOKKAIDO株は食塩濃度7%まで, プロピオン酸菌では17%まで生育可能であったが, 増殖が良好で高い菌数が得られる食塩濃度は, 両菌とも5%以下であった (図2). 0~5%の食塩添加により培養した菌体を用いて流動層造粒を行ったところ, 本菌株では乾燥菌体の生菌数は, 食塩無添加区の40~50%程度 (約 10^8 CFU/gの菌数) 減少しており, 水分活性低下効果は菌種により異なること示された (表2). スターターとして乾燥菌体を添加する場合, 原料乳に対して1%の添加量で通常 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mLオーダーの生菌数となるようにすることが必要となる. そこで流動層造粒時の投入菌液の生菌数を 10^{10} CFU/mLオーダーとすることで, 実用レベルの 10^9 CFU/gオーダーの生菌数を持つ乾燥菌体を得ることができた (表2).

(2) 調製した乾燥菌体の保存性

(1)で調製した乾燥菌体を用いて, 5℃, 20年間の保存条件と同等とされる37℃, 2週間の保存試験⁸⁾を行ったところ, 食塩添加により造粒直後の生菌数は, 無添加に比べると減少した (表3). しかし, 2週間保存後の生菌数 (酸素あり) は, プロピオン酸菌では無添加では 1.2×10^9 CFU/g, 食塩3%添加区では 1.7×10^9 CFU/g, 食塩5%添加区では 9.5×10^8 CFU/gとなり, 食塩3%添加することで保存後の生菌数を高く維持出来ることが分かった. さらに, 造粒直後の生菌数を100%とした時, 保存後の生菌数 (酸素あり) の減少率は, プロピオン酸菌は無添加では41%, 食塩3%添加区では68%, 食塩5%添加区では63%となり, 食塩3%添加区での生菌数の減少率が抑制され, 保存性が良好であることが明らかとなった. また, 酸素なしで保存後の場合も同様の傾向が

見られた. HOKKAIDO株についてもプロピオン酸菌と同様の傾向が見られた. このように保存試験の結果から, HOKKAIDO株およびプロピオン酸菌では水分活性を低下させることで保存性が高まることが推察された.

(3) 乳製品への利用試験

ヨーグルト添加試験では, 対照と同等にHOKKAIDO株が生存し, 賞味期限である14日目まで菌数の維持が可能であることが確認できた (表4). エメンタルタイプのチーズ試作では, 対照と遜色なくガスホールを形成していることが確認された (データ未掲載). このことから, 両菌株ともに対照と同等の性能を有していることが示された.

3. 要 約

当センター保有の乳酸菌HOKKAIDO株およびプロピオン酸菌において, HOKKAIDO株はMRS培地30℃ 25時間, プロピオン酸菌は, GYP培地35℃ 23時間培養し, 投入菌液を 10^{10} CFU/mLオーダーとすることで, 実用レベルの生菌数をもつ乾燥菌体を調製することが可能であることがわかった. また, 培養時に培地に食塩を3%添加して培養すると, 保存性が良好となることが明らかとなった. 調製した乾燥菌体のスターター性能は, 対照と同等であり実用性を有することが示された.

文 献

- 1) Chalat Santivarangkna, Ulrich Kulozik, Petra Foerst, (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, 乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発 (第1報), (1996), 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，乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発(第2報)，(1996)，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，乾燥粉末乳酸菌のスターターの開発(第3報)，(1996)，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) 山田加一郎，中野敦博，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，(2012)，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.
- 6) 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.
- 7) Edwin P. W. Kets, Pauline J. M Teunissen, Jan A. M. deBont, (1996), Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying, *Appl. Environ. Microbiol.*, 96, 1, 259-261.
- 8) 坂根健，西井忠止，伊藤忠義，見方洪三郎，(1996)，L-乾燥法による微生物株の長期保存法，*Microbiol. Cult. Coll.*, 12, 2, 91-97.