

# 酸生成能の高い高温性乳酸桿菌および球菌の新たな選抜方法

徳田瑞貴, 濱岡直裕, 中川良二

## New screening methods for the selection of high acid-producing thermophilic lactococci and lactobacilli

Mizuki Tokuta, Naohiro Hamaoka<sup>1</sup> and Ryoji Nakagawa

To develop new screening methods for the selection of high acid-producing thermophilic lactococci and lactobacilli for yogurt production, we examined the components of the selective culture medium, culture conditions, and pH indicators for detection using indicator strains. Lactococci were selected as yellowish colonies formed by culturing at 42 °C for 48 h under aerobic conditions on modified M17 agar supplemented with 0.01% bromocresol green. Lactobacilli were selected as yellowish colonies larger than 2.0 mm under the same culture conditions as above, using MRS agar supplemented with 0.01% alizarin red. Furthermore, lactococci and lactobacilli could be separated individually from a milk model inoculated with *Streptococcus thermophilus* STI-12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-13 using the screening methods mentioned above.

**KEY-WORDS** : lactococci, lactobacilli, highly acid-producing, thermophilic, acid-producing, pH indicator

**キーワード** : 乳酸菌, 簡易選抜, 分離培地, 酸生成能, pH 指示薬

一般的にヨーグルト製造は、スターターとして乳酸球菌である *Streptococcus thermophilus* と乳酸桿菌である *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* のうち42°C程度の高温で発酵可能で、かつ高酸生成の菌株が用いられている。製造企業の多くは、これらの乳酸菌を乾燥粉末化した市販スターターをヨーグルト製造に活用している。北海道内の乳製品企業からは、ヨーグルト製品の差別化を図るため、従来から用いられる市販スターターとは異なる独自のヨーグルト製造用乳酸菌の取得に対する強い要望がある。

従来、乳酸菌を取得するには、生乳などの試料を乳酸菌分離培地に接種し、培養後に形成したコロニーから乳酸菌を分離した後、耐性試験、発酵試験および菌種同定等が行われる<sup>1)</sup>。乳酸菌分離培地として乳酸菌数測定用

公定培地であるBCP加プレートカウント寒天を使用する場合もあり<sup>2)</sup>、本培地はプロモクレゾールパープル(以下BCP)というpH指示薬が用いられるため、視覚的に乳酸生成菌を判別することが可能だが、変色域が5.2～6.8と中性から弱酸性のため、ヨーグルトの発酵に適した酸生成能の高い菌株以外に、酸生成能の低い菌株も多く分離される。そのため、活性評価等の二次選抜に多大な労力と時間を要し、供試点数が限定される要因となる。

当センターでは、これまでヨーグルト用乳酸菌の選抜方法の省力化に向けて、生乳からヨーグルト製造に適性が見込まれる乳酸菌を検出する方法を検討し、特定のプロテアーゼ遺伝子配列を指標としてヨーグルト製造に適性が見込まれる乳酸菌を検出するスキームを構築した<sup>3)</sup>。しかし、この方法で有用乳酸菌の存在が示唆され

事業名：経常研究

課題名：酸生成能の高い高温性乳酸菌の効率的選抜方法の開発

た試料から、BCP加プレートカウント寒天培地などを用いて乳酸菌分離を試みる場合、ヨーグルト製造に適した乳酸菌以外にも分離される場合があるため、有用乳酸菌の効率的な分離にあたっては、生乳等の分離源から、高温性かつ高酸生産性の乳酸菌を、優先的に生育させ、選択的に検出する手法の開発が必要である。

そこで本研究では、ヨーグルト製造に適した高温性かつ高酸生成の乳酸球菌および乳酸桿菌を簡易に選択分離するための培地組成および培養条件を検討し、新たな選抜方法を確立したので報告する。

## 1. 実験方法

### (1) 供試菌株

高温性かつ高酸生成の乳酸菌指標株として、乳酸球菌、乳酸桿菌それぞれを市販の乳酸菌スターターから単離し、菌種を同定した菌株を用いた。菌種の同定は細菌同定検査キットAPI 50CH（シスメックスバイオメリユー）を用いた。また、長島ら<sup>4)</sup>の設計した16SrRNAプライマー（pA/pD\*）を用いて16SrRNA遺伝子領域の塩基配列（529塩基）を決定し、NCBIのDNAデータベースで相同性を検索する手法により菌種を同定した。

乳酸球菌指標株は市販の乳酸菌スターター STI-12（クリスチャンハンセン）から単離した*Streptococcus thermophilus*をSTI-12株（以下、STI-12）とし、乳酸桿菌指標株は、市販の乳酸菌スターター CH-1（クリスチャンハンセン）から単離した*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*をLB-13株（以下、LB-13）とした。STI-12はM17 broth acc. to TERZAGHI（Merck、以下M17液体培地）、LB-13はDifco™ Lactobacilli MRS Broth（BD、以下MRS液体培地）で42℃、24-30時間前培養したものを使用した。

### (2) 培地調製

#### i) 公定培地の改変（改変公定培地）

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令における乳酸菌数測定用公定培地であるBCP加プレートカウント寒天培地の組成からプロモクレゾールパープル（以下、BCP）を除いた培地を基本培地とし、各種pH指示薬を添加することにより改変公定培地を調製した。すなわち、基本培地の組成は、1Lあたり、標準寒天培地（日水製薬）23.5g、Tween80（富士フィルム和光純薬）1.0gおよびL-システイン塩酸塩（富士フィルム和光純薬）0.1gとした。これにpH指示薬であるアリザリンレッドS（富士フィルム和光純薬、以下AR）、メチルレッド（富士フィルム和光純薬、以下MR）、メチルオレンジ（富士フィルム

和光純薬、以下MO）、プロモクレゾールグリーン（富士フィルム和光純薬、以下BCG）またはプロモフェノールブルー（富士フィルム和光純薬、以下BPB）を0.01%となるよう適宜添加し、NaOHでpH7.0に調整した後、121℃ 15分間滅菌したものを平板培地として用いた。

#### ii) 乳酸球菌選択培地

i) で示した基本培地組成中の標準寒天培地23.5gを除き、M17液体培地42.5gおよび寒天粉末13.0gを加えた培地を改変M17寒天培地とした。pH指示薬を0.01%となるよう適宜添加し、NaOHでpH7.0に調整した後、121℃ 15分間滅菌したものを平板培地として用いた。

#### iii) 乳酸桿菌選択培地

乳酸桿菌用の基本培地の組成は、1Lあたり、MRS液体培地55.0gおよび寒天13.0gとした。pH指示薬を0.01%となるよう適宜添加し、NaOHでpH7.0に調整した後、121℃ 15分間滅菌したものを平板培地として用いた。

### (3) pH指示薬の選定

STI-12は、シャーレ当たり30～300CFUとなるように適宜希釈した後、pH指示薬を添加した改変公定培地に塗抹し、42℃で48時間好気培養を行った。LB-13は、シャーレ当たり30～300CFUとなるように適宜希釈した後、pH指示薬を添加したMRS寒天培地に塗抹し、酸素吸収・炭酸ガス発生剤のアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を入れた嫌気ジャーを使用して42℃で48時間嫌気培養を行った。培養後のコロニー形成およびコロニー周辺部の変色の有無を目視確認した。さらに、コロニー形成し、周辺部に変色が認められた培地について、公定培地に使用されるBCP加プレートカウント寒天培地を対照に、検出される菌数の比較を行った。

### (4) 培地の選定

STI-12およびLB-13をBCP加プレートカウント寒天培地、改変M17寒天培地またはMRS寒天培地にシャーレ当たり30～300CFUとなるように塗抹し、指標菌のコロニー形成の有無、コロニーの大きさや形状、発色などに基いて各種培地における乳酸球菌と乳酸桿菌の選択能を評価した。

### (5) 生乳モデルによる選抜方法の評価

(3)pH指示薬の選定と(4)培地の選定によって乳酸球菌と乳酸桿菌それぞれの生育に適すると推定されたpH指示薬、選択培地および培養条件を組み合わせ、以下の条件で生乳を用いたモデル試験を行った。STI-12とLB-13の前培養液を1:1の比率で混合した後、遠心分離（4℃、5000rpm、5分間）し、菌体ペレットを生理食塩水で2回洗浄後、生理食塩水に懸濁したものを菌体懸濁液とし

た。菌体懸濁液を適宜希釈したものを生乳モデルの滅菌10%スキムミルクに $1.2 \times 10^3$ CFU/ml程度になるように接種し、乳酸球菌選択培地および乳酸桿菌選択培地に塗抹した。乳酸球菌選択培地は、42°Cで48時間好気培養を行い、周辺部に変色が認められたコロニーを目視判定陽性とした。乳酸桿菌選択培地は、42°Cで48時間嫌気培養を行い、周辺部に変色が認められた2.0mm以上のコロニーを目視判定陽性とした。

各培地で目視判定陽性と判定したコロニーから釣菌、検鏡し、乳酸球菌と乳酸桿菌を判別した。目視判定の結果と検鏡結果の一致率を算出することにより、選抜方法の評価を行った。

## 2. 実験結果と考察

### (1) 酸生成の高い乳酸菌の分離に適したpH指示薬の選定

公定培地であるBCP加プレートカウント寒天培地を対照とし、公定培地のBCPを各種pH指示薬に置換した改変公定培地および各種pH指示薬を添加したMRS寒天培地における指標菌株STI-12およびLB-13のコロニー形成およびコロニー周辺部の変色について評価を行った。その結果、いずれの指標菌株においても、BCGおよびARを添加した培地においてBCPと同様にコロニー形成およびコロニー周辺部の色調変化が認められ（表1）、目視で容易に判別可能であった。pH指示薬の変色開始pHは、BCPが6.8であるのに対して、ARが5.2、BCGが5.4である。ヨーグルト用乳酸菌は、製造時にpH4.6以下に

達する高い酸生成能が求められることから、ARおよびBCGをpH指示薬として用いることで、従来法よりも発酵乳製造に適性の高い菌株の選抜が可能と考えられた。

次に、BCGまたはARが指標菌株に与える生育阻害の有無を確認するため、公定培地のBCP加プレートカウント寒天培地を対照として、BCGまたはARを添加した各培地について、検出される菌数の比較を行った。その結果、各指示薬を添加した改変公定培地で培養したSTI-12は、BCGを使用した培地では対照と同程度の菌数で、ARを使用した培地では菌数が減少した。ARにはSTI-12株の生育を阻害する働きがあることが示唆された。各指示薬を添加したMRS培地で培養したLB-13は、ARおよびBCGを使用した場合にBCP以上の菌数を検出する傾向が認められた（図1）。これは対照のBCP加プレ

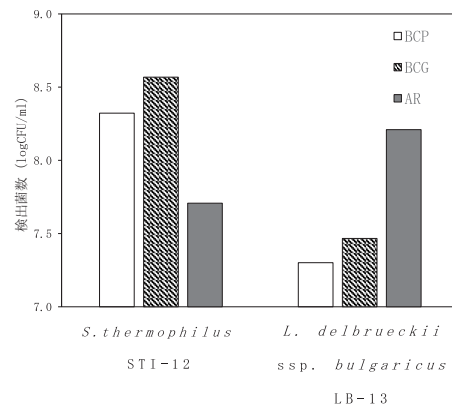


図1 pH指示薬が指標菌株の検出菌数に及ぼす影響

表1 各種pH指示薬添加培地における指標菌株のコロニー形成および周辺部の変色

指標菌	添加pH指示薬と変色域	コロニー形成	変色
<i>Streptococcus thermophilus</i> STI-12	BCP (黄) 5.2 - 6.8 (紫)	+	+
	MR (黄みの赤) 4.2 - 6.2 (黄)	+	-
	BCG (黄) 3.8 - 5.4 (青)	+	+
	AR (黄) 3.7 - 5.2 (黄みの赤)	+	+
	MO (黄みの赤) 3.1 - 4.4 (赤みの黄)	+	-
	BPB (黄) 3.0 - 4.6 (青紫)	+	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB-13	BCP (黄) 5.2 - 6.8 (紫)	+	+
	AR (黄みの赤) 4.2 - 6.2 (黄)	++	+
	BCG (黄) 3.8 - 5.4 (青)	+	+

*S. thermophilus* STI-12は、乳酸菌数測定用公定培地に含まれるpH指示薬BCPを各種pH指示薬に置換した培地で好気培養後に、*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-13は、各種pH指示薬を添加したMRS寒天培地で嫌気培養後にコロニー形成および周辺部の変色を評価した。培養温度および時間は双方ともに42°C、48時間とした。

指示薬；BCP：プロモクレゾールパープル，MR：メチルレッド，BCG：プロモクレゾールグリーン，AR：アリザリンレッド，BPB：プロモフェノールブルー

コロニー形成；++：直径2.0mm以上 +：直径0.5mm-2.0mm

変色；+：変色を識別可能 -：変色を識別：直径2.0mm以上

トカウント寒天培地と比べて乳酸菌用培地であるMRS培地の組成成分がLB-13の生育に適しているため、生育が促進され対照よりも菌数が増加したと考えられる。加えてBCGがLB-13の生育を阻害、もしくはARが生育を促進させたため、AR添加培養時の菌数が多く検出されたと考えられる。以上の結果から、高温性で酸生成能の高い乳酸菌分離に向けた乳酸球菌選択培地のpH指示薬にはBCG、乳酸桿菌選択培地のpH指示薬にはARが最も適していると考えられた。

## (2) 選抜方法の設定

平板培地を使用した乳酸菌の分離にあたっては、シャーレ上に球菌と桿菌が混在して生育することが多い。そのため、平板上で生育するコロニーについて、pHに基づく発色だけでなく、培地組成や培養条件によって、コロニー形状やその大きさに違いをもたらすことができれば、球菌と桿菌を容易に鑑別することができる。

pH指示薬選定試験で用いたMRS寒天培地は、乳酸桿菌の発育を支持する培地であり<sup>5)</sup>、pH指示薬選定試験でも発育の支持を示唆する結果が示された。乳酸球菌の培地には、BCP加プレートカウント寒天培地のpH指示薬を置換した改変公定培地を用いたが、BCP加プレートカウント寒天培地は、乳酸球菌と乳酸桿菌のいずれも発育することが報告されており<sup>6)</sup>、乳酸球菌と乳酸桿菌の選択能はない。そこで、両者を生育度合いの差で判別するため、基礎となる培地の種類を検討した。乳酸球菌の検出用に改変公定培地中の標準寒天培地をM17寒天培地<sup>7)</sup>に置き換えたもの、乳酸桿菌の検出用には既報により乳酸桿菌の生育を指示することが報告されているMRS寒天培地を用いた。BCP加プレートカウント寒天培地、改変M17培地およびMRS寒天培地における各指標菌のコロニー形成を評価した結果を表2に示した。BCP加プレートカウント寒天培地は、いずれの指標菌も同等のコロニー形成であり、選択能が認められなかった。改良M17寒天培地は、LB-13よりもSTI-12のコロニーサイズが大きく、乳酸球菌の発育を支持することが明

らかとなった。また、MRS寒天培地は、STI-12よりもLB-13のコロニーサイズが大きく、直径2mm以上の形成が認められ、既報の通り<sup>6)</sup>、乳酸桿菌の選択培地として有効であった。よって、乳酸球菌および乳酸桿菌を判別するための基礎となる培地として、それぞれ改変M17寒天培地、MRS寒天培地を選択培地として選定した。

従来のBCP加プレートカウント寒天培地による乳酸菌分離の場合、培養温度は37°Cが広く用いられる。しかし、一般的に高温性乳酸菌の増殖至適温度は37～45°C付近、中温性乳酸菌の増殖至適温度は25～37°C付近とされており<sup>8)</sup>、当該温度では中温性乳酸菌が増殖するため、高温性乳酸菌の選択分離には適さない。本試験に使用した高温性乳酸菌STI-12およびLB-13の増殖至適温度は42～43°Cであり、これより高い温度では増殖が抑制される可能性がある。予備試験において、中温性乳酸菌4株と高温性乳酸菌4株の増殖温度を比較した結果、42°Cで中温性乳酸菌が増殖せず高温性乳酸菌のみが増殖した。各試験の対照培地においても42°Cで指標菌株が十分に生育していることから、培養温度は42°Cが適切であると考えた。

一般的に乳酸菌は通性嫌気性を示し、クエン酸回路は一部しか持たないため、生育に酸素は必要なく、むしろ酸化ストレスの発生源となるため、嫌気的環境で生育が向上するものが多い。本研究においても、LB-13は好気条件で生育した場合、扁平・うろこ状のコロニーが出現し、酸の生成が減少するなど、生育に異常がみられ、正常なコロニーが認められなかった（データ非掲載）。

一方、Tharumarajらは、*S. thermophilus*を優先的に増殖させるには、好気培養が有効であることを報告している<sup>6)</sup>。本研究においても同様の結果が得られた。

したがって、乳酸球菌の選択はBCG加改変M17寒天培地を用いて42°Cで48時間好気培養、また、乳酸桿菌の選択にはAR加MRS寒天培地を用い、42°Cで48時間嫌気培養する条件が、高温性・高酸生成乳酸菌の選抜方法として妥当であると考えられた（表3）。

表2 乳酸桿菌および乳酸球菌の分離に用いる基礎培地の検討

指標菌株	対照	改変M17寒天培地	MRS寒天培地
<i>Streptococcus thermophilus</i> STI-12	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LB-13	+	±	++

対照は乳酸菌数測定用公定培地であるBCP加プレートカウント寒天培地とした。

*S. thermophilus* STI-12は、各種培地で42°Cで48時間好気培養後に評価した。

*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-13は、各種培地で42°Cで48時間嫌気培養後に評価した。

++：直径2.0mm以上 +：直径0.5mm-2.0mm ±：直径0.5mm未満

表3 高温性・高酸生成乳酸菌の分離方法

対象	培地	培養条件
乳酸球菌	BCG加改変M17寒天培地	42°C, 48h, 好気培養
乳酸桿菌	AR加MRS寒天培地	42°C, 48h, 嫌気培養

## (3) 生乳モデルによる選抜方法の評価

確立した選抜方法の有用性を明らかにするため、乳酸球菌と乳酸桿菌の指標菌を混合した菌液を添加した生乳モデルを用いて乳酸球菌および乳酸桿菌の選択分離について検証を行った。検証は、目視判定と検鏡による判定の一致率で評価した。BCG加改変M17寒天培地において、乳酸球菌と判定された31コロニー、改良M17寒天培地で乳酸桿菌と判定された37コロニーをそれぞれ検鏡により形態観察した結果、全てのコロニーにおいて目視と検鏡による判別結果が一致した(表4, 図2)。

以上より、酸生成能の高い高温性乳酸菌指標株である乳酸桿菌および球菌は各々 BCG加改変M17寒天培地を用いて42°Cで48時間好気培養する方法とAR加MRS寒天培地を用いて42°Cで48時間嫌気培養する方法により確実に分離することが可能となり、従来法では困難であった中温性乳酸菌や酸生成能の低い乳酸菌を除外し、ヨーグルト製造に適した乳酸菌を簡易に選抜する方法として利

用可能であることが示唆された。

## 4. 要約

ヨーグルト製造に適した酸生成能が高く、高温性の乳酸球菌および乳酸桿菌を簡易に選抜する方法を検討した。乳酸球菌はBCG加改変M17寒天培地を用いて42°Cで48時間好気培養、乳酸桿菌はAR加MRS寒天培地を用いて42°Cで48時間嫌気培養する方法により、従来の方法より簡易に選択分離できる可能性を示した。

## 5. 文献

- 1) 鈴木チセ (2009). 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作. 食品機能性評価マニュアル集 第三集, pp.41-48.
- 2) 都築正男, 藤野布久代, 西尾実紗, 北田善三 (2019). クズの根からの乳酸菌の分離とその特性. 奈良県産業振興総合センター研究報告, 45, 13-19.
- 3) 濱岡直裕 (2020), ヨーグルト製造用途乳酸菌の効率的な評価選抜スキームの構築, 道総研食品加工研究センター研究報告, 15, 11-20.
- 4) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸 (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ

表4 生乳モデルによる分離方法の評価結果

対象	培地	目視判定 陽性数	検鏡判定		一致率 (%)
			乳酸球菌数	乳酸桿菌数	
乳酸球菌	BCG加改変M17寒天培地	31a	31	0	100
乳酸桿菌	AR加MRS寒天培地	37b	0	37	100

生乳モデルは10%スキムミルクに*S. thermophilus* STI-12と*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB-13を1:1の菌数で添加して調製した。

a: 周辺が変色したコロニー数

b: 周辺の培地が変色した直径2mm以上のコロニー数

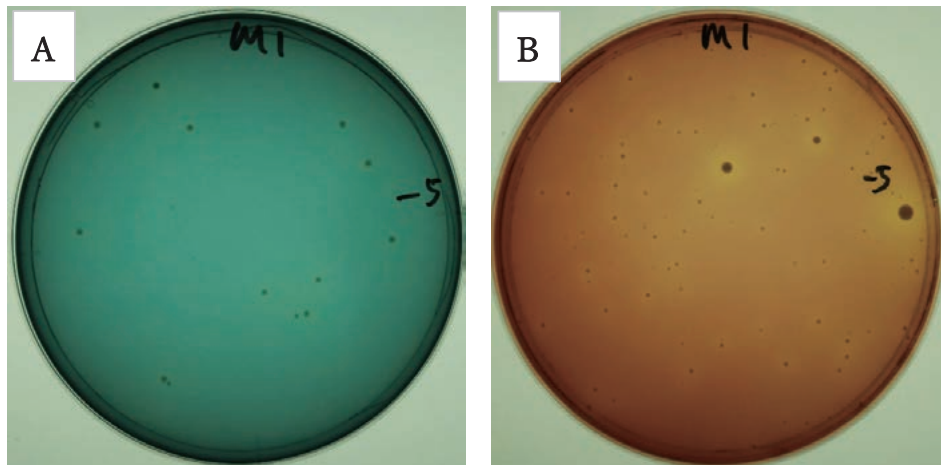


図2 生乳モデルによる選抜方法の評価

A: BCG加改変M17寒天培地 B: AR加MRS寒天培地

- 解析への応用, 日本食品科学工学会誌45(1), 58-65.
- 5) De Man, J. C., Rogosa, M., Elisabeth Sharpe, M.(1960). Medium for the cultivation of lactobacilli., *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135.
- 6) Tharmaraj, N. and Shah, N. P. (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.
- 7) Terzaghi, B. E. and Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, **29**(6), 807-813.
- 8) 加藤丈雄 (2007). 乳酸菌の分類と性質. あいち産業科学技術総合センター 食品工業技術センター ニュース 平成19年度1月号 (食工技セ版), p.2.