

凍結乾燥乳酸菌の実用性に関する研究

I. 12ヵ月保存中の生存率, 生酸性の変化について

加香芳孝*・青木孝良*・柳田宏一・小野田實*・花田博之

(1984年9月29日 受理)

Studies on the Practical Utility of the Lyophilized Dairy Microorganisms

I. Changes of Their Viability and Acid Producing Activity during the Frozen Preservation Lasting for 12 Months

Yoshitaka KAKO*, Takayoshi AOKI*, Kōichi YANAGITA,
Minoru ONODA* and Hiroyuki HANADA

緒 言

最近, 乳製品工業において凍結乾燥した乳酸菌を発酵乳やチーズ製造のスターターとして利用する方法が世界的に広く普及してきている。この方法は従来の継代培養により菌株を保存維持しつつ利用する方法に比べれば, それに要する労力, 時間, 資材費などが著しく軽減されるばかりでなく, その間の雑菌による汚染やフェージ事故の防止にもつながるうえ, 輸送を要する場合などきわめて便利である。しかし, 以上のような利点はあっても, 生物である細菌を凍結乾燥粉末として保存し使用するということは, 細菌に対しては, いわば不自然な生存形態を強要しているわけであるから, 凍結乾燥処理の間に細菌に何らかの損傷を与えていることが考えられるし, また, その保存法, 保存可能期間などにも種々の問題や制約が存在するよう考えられる。

本学畜産製造学研究室には, 約30年前に農林省畜産試験場より分譲をうけた九州大学畜産製造学研究室を經由して継代培養により保存維持されている乳酸菌4株があるが, これらの菌株は, 毎年, 畜産製造学実験, 実習の一部として行われる発酵乳製品の製造に用いられている。これは今後とも継続される予定であるが, これらの菌株の保存維持には, 毎月2回の継代培養を要し, 永年にわたる維持に要した労力と経費は相当な額にのぼるものと思われるし, 今後とも必要となる。

そこで今回, これまでに公表されている研究報告等を参照して, 現有の菌株に適当と思われる凍結乾燥保存法を採用し, その方法によって菌株の保存が安定かつ確実に行えるか否かを一応確認したうえで, 今後は簡便かつ経済的な保存法に切り換えてゆく根拠とするために, 一年間にわたる本研究を実施したので, その結果について報告する。

材料と方法

1. 使用菌株: 昭和32年頃, 農林省畜産試験場より九州大学農学部畜産製造学研究室に分譲され, 昭和40年以降鹿児島大学農学部畜産製造学研究室に引き継がれ, 以来継代培養法により保存維持されてきた汎用乳酸菌4菌種 (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus*

* 畜産製造学研究室 (Laboratory of Animal Products Processing Research)

thermophilus, *Streptococcus lactis*) を用いた。

2. 凍結乾燥菌株の調製

凍結乾燥菌株の調製にあたっては上記4菌種をそれぞれ滅菌脱脂乳培地で3回更新培養し、活力を十分に与えたものを用いた。凍結乾燥を実施する場合、菌体の損傷をできるだけ防ぐ意味から次の4とおりの集菌方法を用いた。

(1) 集菌方法

1) 方法I: 矢野ら⁸⁾の方法に準拠し、菌の培養を、単純にその10倍量の滅菌脱脂乳培地で希釈したものを用いた。

2) 方法II: 森地ら³⁾の方法をやや改変した方法、すなわち、各菌の脱脂乳培養1 mlに9 mlの1%グルタミン酸ナトリウム溶液を加えて混合後、4,000 rpm, 15分間遠心分離して、上澄はすて去り、下層のペースト状沈澱に、さらに1%グルタミン酸ナトリウム溶液を総量10 mlとなるように加えて混合したものを用いた。

3) 方法III: Özalp & Özalp⁶⁾の方法に準拠した方法で、10%還元脱脂乳に8%のシュークロースを溶解混合し、滅菌冷却後、菌を接種培養(1日)し、さらにこれに1.5%グルタミン酸ナトリウム溶液を1%添加混合したものを用いた。

4) 方法IV: *Str. lactis* のみについて Yang & Sandine⁷⁾の方法に準拠した方法、すなわち、まず、100 mlのA培地(2%トリプトン, 1%酵母エキス, 2.5%グルコース, 2.5%ラクトースを水に溶解して、20%アンモニア水でpH 6.3に調整後滅菌、冷却したもの)に接種培養(30°C, 14~17時間)後、7,900×g 20分遠心分離して得られるペースト状の沈澱に、60 mlのB培地(22%還元脱脂乳に同容の30%グリセロリン酸ナトリウム溶液を混合したもの)を加えて混合したものを用いた。

なお、滅菌はすべて100°Cでの間断滅菌法で行った。また、培養温度は*Str. lactis*のみは30°C、他の3種の菌は37°Cで行った。

(2) 凍結乾燥の方法

上記のようにして調製した集菌液は、すべて滅菌10 ml容バイアル瓶中に1~2 mlずつ分注し、凍結乾燥用ゴム栓を施し、ただちに-20°Cのフリーザーに入れ、1夜放置して十分に凍結させた。翌朝凍結乾燥機(Labconco社, FD-8型)に移し、凍結乾燥させたが、この間、温度はまったくかけず、15時間乾燥を続けた。

(3) 保存条件

乾燥を終った後はバイアル瓶のまま、真空用デシケーターに移し、真空ポンプをつないで10分間脱気し、ついで窒素ガスを送ることによって窒素ガス置換を行ない、デシケーターから取り出して、すばやくゴム栓をしめるとともに、その上からアルミニウム製キャップをのせ、ハンドキャップで締めつけ密封した。密封したバイアル瓶は-20°Cの凍結庫に移し保存した。保存期間は1年とし、その間、保存直後、3, 6, 9, 12ヵ月目にバイアル瓶1個ずつを取り出し、下記の方法により保存菌の活性を試験した。

(4) 活性試験法

1) 生菌数: バイアル瓶のゴム栓をはずし自動秤上で凍結乾燥前の重量となるよう、滅菌蒸留水(室温)を加えて復水、混和して得られる復水菌懸濁液を常法²⁾により段階希釈し、 $\times 10^8 \sim \times 10^{12}$ 希釈として、BCPプレート寒天培地を用いて平板培養し生菌数を計測した。なお、対照として従来の継代培養を行ってきた菌株を各集菌培地に3回更新培養したものについて計測し比較した。

2) 酸度および pH: 9 ヶ月凍結保存菌株を用い、復水菌懸濁液 0.1 ml を滅菌脱脂乳培地 20 ml に接種培養 (1 日) し、次にそれから 1 白金耳、新たな 20 ml の滅菌脱脂乳培地に接種培養する更新培養を 2 回くり返した。各段階で酸度と pH を測定することにより各菌の生酸性を検する方法と、更新培養はせずに 3 日間連続培養したものについて計測する方法の 2 とおりの方法で検討した。

酸度は培養 10 g を秤取し、常法¹⁾により滴定酸度を求めて乳酸%として表わし、pH は日立掘場 F-5 型 pH メーターでガラス複合電極 (No. 6028) を用いて直接各培養について測定した。

(5) 水分の定量

凍結乾燥菌培養中の水分含量が長期凍結保存中に菌体を損傷させる可能性が考えられるので、常法により 105°C で加熱乾燥し水分含量を測定した。

結果と考察

各種乳酸菌が凍結乾燥法によって保存されうるとはよく知られており、すでに工業的に実用段階にあるが、細菌菌株の保存も他の生物の遺伝子の保存と同様に、絶対に死滅させることのないように配慮する必要がある。そのためには凍結乾燥処理に関わる諸条件のほか、保存条件、復水条件、保存期間などの点について細菌が確実に生存し得る条件を見出しておく必要があるし、さらに、乳酸菌の特性である乳酸産生能力に変化がないか否かについても検討しておく必要がある。そこで本研究では従来継代培養により保存維持して使用してきた菌株について、凍結乾燥し 1 ヶ年にわたり凍結保存しながら生菌数のカウントによる生存率および生酸活性を主として検討した。その結果は次のとおりである。

1. 生存率について

前記 4 種の汎用乳酸菌株を方法 I, II, III, IV で集菌し凍結乾燥後、-20°C で保存しつつ定期的に生菌数を培養測定した結果を第 1 表に示した。左側に生菌数、右側に対照に対する各期間保存後の生菌数の%を示した。

以上の結果より、まず、本研究で採用した 4 種の集菌方法では、方法のちがいで菌数の差がかなりみられる。これは方法によって遠心分離による集菌を行ったり、あるいは培地に糖を加えたりするため、菌の増殖に差を生じるのであろうと思われる。ともかく、*Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Str. thermophilus* については方法 I よりも II が、II よりも III が凍結乾燥前の状態 (対照) でも菌量が多くなることがわかる。方法 IV は *Str. lactis* のために特に III の代りに試みた方法であったが、方法 II とほぼ同一オーダーであった。

つぎに凍結乾燥を行うと、その直後においても各乳酸菌は大なり小なり損傷を受け、生菌数は減少している。特に集菌方法 I では、どの菌株も減少が顕著で生存率は 10^2 のオーダーで減少した。方法 II では *Lb. bulgaricus* と *acidophilus* では方法 I と変らないが、*Str. thermophilus* と *lactis* ではかなり増加している。さらに方法 III では 70% 以上の生存率を示し、この方法での集菌がかなり好結果を示すことがわかる。*Str. lactis* については特に方法 IV で行ったのであるが、III に比べて必ずしもよい結果とはならなかった。

凍結乾燥時の細菌の損傷を防止するのに有効な物質として、後述するように、酸性、塩基性アミノ酸や糖が知られており、本研究の結果もこれらの添加による集菌方法が有効であることを明らかにしている。しかも方法 III が示すように有効なアミノ酸と糖との併用がより有効であることを示し

第1表 各種集菌方法により調製された凍結乾燥乳酸菌の凍結保存中における生菌数及び生存率
 Table 1. Viable cell count and survival percent noted in the frozen preservation periods of the four kinds of lyophilized lactic microorganisms prepared by four kinds of methods

集菌方法 Method	乳酸菌の種類 Kind of lactic microorganism	生菌数 ($\times 10^{10}/ml$) Viable cell count												生存率 ⁽¹⁾ Survival percent ⁽¹⁾ (%)											
		凍結保存期間 (月) Preservation period (month)						凍結保存期間 (月) Preservation period (month)						凍結保存期間 (月) Preservation period (month)											
		a ⁽²⁾	0	3	6	9	12	a ⁽²⁾	0	3	6	9	12	a ⁽²⁾	0	3	6	9	12						
I ⁽³⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	33	0.1	0.4	0.9	0.3	1.2	100	0.4	1.2	2.8	0.9	3.6	100	0.4	1.2	2.8	0.9	3.6						
	<i>Lb. acidophilus</i>	41	1.1	1.1	1.7	0.5	1.3	100	2.7	2.7	4.2	1.3	3.2	100	2.7	2.7	4.2	1.3	3.2						
	<i>Str. thermophilus</i>	35	0.9	1.0	0.7	1.0	0.9	100	2.5	2.9	2.0	2.9	2.6	100	2.5	2.9	2.0	2.9	2.6						
	<i>Str. lactis</i>	95	4.0	1.6	4.0	3.0	3.2	100	4.2	1.7	4.2	3.2	3.4	100	4.2	1.7	4.2	3.2	3.4						
II ⁽⁴⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	53	2.4	0.8	3.0	4.8	5.0	100	4.5	1.5	5.7	9.1	9.4	100	4.5	1.5	5.7	9.1	9.4						
	<i>Lb. acidophilus</i>	89	2.2	2.3	3.7	7.4	5.5	100	2.5	2.6	4.2	8.3	6.2	100	2.5	2.6	4.2	8.3	6.2						
	<i>Str. thermophilus</i>	16	8.5	1.2	5.8	8.4	4.6	100	53.1	7.5	36.3	52.5	28.8	100	53.1	7.5	36.3	52.5	28.8						
	<i>Str. lactis</i>	880	540	410	560	470	510	100	61.4	46.6	63.6	53.4	58.0	100	61.4	46.6	63.6	53.4	58.0						
III ⁽⁵⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	180	140	170	190	150	140	100	77.8	94.4	105.6	83.3	77.8	100	77.8	94.4	105.6	83.3	77.8						
	<i>Lb. acidophilus</i>	190	140	140	190	150	110	100	73.7	73.7	100	79.0	57.9	100	73.7	73.7	100	79.0	57.9						
	<i>Str. thermophilus</i>	180	130	140	190	190	160	100	72.2	77.8	105.6	105.6	88.9	100	72.2	77.8	105.6	105.6	88.9						
IV ⁽⁶⁾	<i>Str. lactis</i>	880	260	280	260	370	250	100	29.6	31.8	29.6	42.1	28.4	100	29.6	31.8	29.6	42.1	28.4						

(1): 生存率は従来の継代培養法による菌数に対する、凍結乾燥菌培養のそれぞれの保存期間後における菌数の百分率として示されている。

Survival percent is shown as the percentage of viable cell count noted after the respective preservation period of lyophilized lactic microorganism culture to the viable cell count of conventional culture

(2): a は従来の継代培養を示す。 (5): Özalp & Özalp (1979)⁽⁵⁾の方法による

a shows conventional culture After Özalp & Özalp (1979)⁽⁶⁾

(3): 矢野ら (1960)⁽³⁾の方法による (6) Yang & Sandine (1979)⁽⁷⁾の方法による

After Yano *et al.* (1960)⁽³⁾ After Yang & Sandine (1979)⁽⁷⁾

(4): 森地ら (1964)⁽⁴⁾の方法による (7) Yang & Sandine (1979)⁽⁷⁾の方法による

After Morichi *et al.* (1964)⁽⁴⁾ After Yang & Sandine (1979)⁽⁷⁾

