

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ことがよく知られており、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⁾

ている。しかし、Yang & Sandine⁷⁾の推奨するグリセロリン酸ナトリウムは期待される程の効果は示さなかった。

保存期間との関係についてみると、方法Ⅲが最も高水準に生存率を保持しているが、一般的にみて、いずれの方法でも凍結保存後3ヵ月で生存率はやや低下するが6ヵ月目に回復し、その後の6ヵ月間に再び低下してゆくようである。これらの点から考えると、活力の旺盛な菌株の保存期間としては一応6ヵ月間とみなし、6ヵ月毎に更新するのが安全であるが、しかし、単に菌株の保存維持のためであれば、生菌数からみて12ヵ月更新でも差支えないように思われる。最近の報告⁵⁾でも凍結乾燥菌を更新培養することなく、直接乳製品製造用のスターターとして使用する場合は、6ヵ月を保存期間としているものが多く見受けられる。なお、菌株の保存には、凍結乾燥菌の復水条件、さらにその後の菌の損傷回復を促がす更新培養法などの検討が重要であると示唆されているので、今後これらについても検討するとともに、これらの対策を施した上での保存可能期間を見出したいと考えている。

保存温度については、室温より低温の方が種々の意味からよいとされている。本研究では凍結乾燥後の長期保存条件として冷蔵(+5°C)保存とせず凍結(-20°C)保存を採用したが、これは予備実験の結果、6ヵ月の保存中における生存率の低下が前者より後の方が少ないことが見出されたことによる。

2. 生存率と水分含量との関係

細菌細胞を凍結あるいは凍結乾燥した場合、何らかの損傷を受けるが、生存率をできるだけ高めるのに有効な保護物質や、それらの物質が示す保護効果の機構解明については、すでに多くの研究がある⁴⁾。乳酸菌についても同様であって、現在第2表に示されているような物質が有効であることが知られている⁴⁾。本研究では、このうち、有効高分子物質を含むものとして集菌用培地4種に共通して脱脂乳が用いられているが、これにさらに有効性の大きい低分子物質としてグルタミン酸とシュクロースが用いられている。これらの物質による保護効果はつぎのように考えられている⁴⁾。すなわち、凍結または凍結乾燥による細菌の損傷個所は細胞膜であり、これに対して脱脂乳の添加は、その中のタンパク質を主とする高分子物質の保護コロイド性及び親水性のためであり、さらに親水性の大きい低分子物質としてのラクトース、シュクロース、グルタミン酸の添加は結合水の保持を結果し、そのため細胞膜の損傷が抑制されるので膜の透過性が保護される。その結果、復水時またはその後細胞成分の流出や有害物質の侵入が阻止されるので細胞内RNA合成の維持につながるためであると考えられている。

そこで本研究で行った4種の集菌方法による凍結乾燥菌株の水分含量を実際に定量してみたところ第3表のような成績をえた。表より明らかなおり、同一条件で行った凍結乾燥菌中に含まれる水分含量は、集菌方法によって差がみられる。すなわち、方法Ⅰ、Ⅱでは菌種にかかわらず1.2%以下であるのに対し、方法Ⅲでは、それより高い2.5~3.2%であり、方法Ⅳでは特に高く6.8%であった。

この水分含量と生存率との関係を菌種と関連させて考慮すると、菌体の比較的大きい乳酸桿菌は低水分含量で損傷を受けやすく、これに対して菌体の小さい連鎖球菌では損傷を受けにくいことが考察され興味深い。

なお、*Str. lactis*に適する方法として採用した方法Ⅳによる同菌株は、含水率が最も高く6.8%を示しているが、それよりも含水率の低い方法Ⅱによる同菌株よりも全保存期間にわたって生存率

第2表 実用されている凍結乾燥損傷保護物質リスト⁴⁾Table 2. List of protective compounds in practical use⁴⁾

群 Group	保護物質 Protective compounds
中性化合物 Neutral compounds	グリセリン, エチレングリコール, プロピレングリコール, Glycerol, Ethylene glycol, Propylene glycol, ジメチルスルフォキシド, アセトアミド Dimethyl sulphoxide, Acetamide
低分子化合物 Low molecular compounds	グルタミン酸, アスパラギン酸, リンゴ酸, Glutamic acid, Aspartic acid, Malic acid, ラクトビオン酸, グルコース, ラクトース, Lactobionic acid, Glucose, Lactose, シュクロース, ラフィノース, ソルビトール, Sucrose, Raffinose, Sorbitol, キシリトール, DL-スレオニン, アルギニン, リジン Xylitol, DL-Threonine, Arginine, Lysine
高分子化合物お よび加水分解物 High molecular compounds and hydrolysates	アルブミン, セラチン, ムチン, ペプトン, 肉エキス, Albumin, Gelatin, Mucin, Peptone, Meat extract, 酵母エキス, 可溶性澱粉, デキストラン, Yeast extract, Soluble starch, Dextran, アルギン酸, ペクチン, アラビヤゴム, Alginate, Pectin, Gum arabic, ポリビニールピロリドン, カルボキシメチルセルロース, Polyvinyl pyrrolidone, Carboxymethyl cellulose, 血清, 脱脂乳 Serum, Skim milk
特殊化合物 Special compounds	ヒドロキシルアミン, セミカルバジド, アスコルビン酸 Hydroxylamine, Semicarbazide, Ascorbic acid

は低い結果となった。しかし、同菌株は予備実験で+5°Cの冷蔵保存を行った場合はむしろ方法IIによるものよりも高い生存率を示したことから、おそらく、残存水分量が比較的多いため、それがかえって凍結状態(-20°C)での保存で細菌体に影響を及ぼしたものと考えられる。したがって、今回実験しなかったが、*Str. lactis* についても方法IIIで集菌して凍結乾燥することにより水分含量を2.5~3.5%程度として凍結保存すれば、第1表にみられる *Str. thermophilus* 程度の生存率が得られるものと推定される。

3. 生酸活性の検討

供試乳酸菌4種の凍結乾燥および以後の保存中における生存率の変化については上記のとおりであったが、乳酸菌を使用する目的は主として乳酸発酵させることにあり、したがって生存菌には十分な乳酸発酵の能力が保存されていなければならない。そこで乳酸発酵の第1の指標となる乳酸の生成活性を検討するため、9ヵ月保存菌の培養に伴う酸度およびpHの変化の面から検討した。その結果は第4表に示したとおりである。

測定の結果、全般的に酸度とpHの変化の関係は互いに良く一致しているため、ここでは酸度について考察することにするが、次の点が注目される。

第3表 各種集菌法により調製された凍結乾燥菌培養の水分含量

Table 3. Moisture contents of the four kinds of lyophilized lactic microorganism cultures prepared by four kinds of methods

集菌方法	乳酸菌の種類	凍結乾燥菌培養中の水分含量
Method	Kind of lactic micro-organism	Moisture contents in the lyophilized cultures
I ⁽¹⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	1.2 (%)
	<i>Lb. acidophilus</i>	1.0
	<i>Str. thermophilus</i>	1.2
	<i>Str. lactis</i>	0.8
II ⁽²⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	0.7
	<i>Lb. acidophilus</i>	1.0
	<i>Str. thermophilus</i>	0.4
	<i>Str. lactis</i>	0.3
III ⁽³⁾	<i>Lb. bulgaricus</i>	3.2
	<i>Lb. acidophilus</i>	2.8
	<i>Str. thermophilus</i>	2.5
VI ⁽⁴⁾	<i>Str. lactis</i>	6.8

(1): 矢野ら (1960)⁸⁾の方法による
After Yano *et al.* (1960)⁸⁾

(2): 森地ら (1964)³⁾の方法による
After Morichi *et al.* (1964)³⁾

(3): Özalp & Özalp (1979)⁶⁾の方法による
After Özalp & Özalp (1979)⁶⁾

(4): Yang & Sandine (1979)⁷⁾の方法による
After Yang & Sandine (1979)⁷⁾

まず、9ヵ月凍結保存された各菌株の復水懸濁液 0.1 ml を 20 ml の滅菌脱脂乳培地に接種し、1日培養した場合、*Str. lactis* では集菌方法Ⅳ、他はⅢで処理されたものが他の方法で処理されたものよりも高い酸度を示した。

つぎにこれを更新培養した場合、対照にみられるように、一般に更新培養が反覆されるにつれて酸度は、ほぼ同一水準を保つか、上昇するのが普通である。ところが方法Ⅰ、Ⅱで処理されたものはそのようになったものの、方法Ⅲ、Ⅳで処理されたものはむしろ低下している。

一方、連続3日間培養したものでは、方法Ⅰ、Ⅱで処理したものがほぼ対照と同一の酸度にまで上昇しているのに対して、方法Ⅲ、Ⅳで処理したものは、酸度の上昇は対照に比べて意外に低い。このような結果となる原因としては、まず最初に復水懸濁液を 0.1 ml 接種した脱脂乳培地中で高い酸度が生じたのは、測定はしていないが接種菌量が多かったためで、決して生酸活性が大であるためではないように考えられる。それは以後の、1白金耳の接種による更新培養では酸度が低下していることからうかがえるし、さらに3日間の連続培養の結果もその点を示していると思われる。つまり、前項で生存率が高く、かつ凍結乾燥菌株の水分含量が 1.2% 以上であった集菌方法で処理され凍結乾燥、保存された菌株は、生存率は高いが、生酸活性には何らかの損傷を受けて劣化しているものと推定される。以上から、今回供試した4種の乳酸菌の凍結乾燥保存法としては、生存率はやや低いが生酸活性を重視すれば、やはり水分含量の少ない 1.2% 以下となる集菌方法の方が好

第4表 各種集菌法により調製された凍結乾燥乳酸菌培養の9ヵ月凍結保存後の生酸活性
 Table 4. Acid producing activity of the lyophilized lactic microorganism cultures prepared by four kinds of methods after 9 months of frozen preservation

	乳酸菌の種類 Kind of lactic microorganism															
	<i>Lb. bulgaricus</i>				<i>Lb. acidophilus</i>				<i>Str. thermophilus</i>				<i>Str. lactis</i>			
	更新培養回数 No. of propagation		集菌方法 Method		集菌方法 Method		集菌方法 Method		集菌方法 Method		集菌方法 Method		集菌方法 Method			
酸度 (%) Acidity	a ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	II ⁽³⁾	III ⁽⁴⁾	a ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	II ⁽³⁾	III ⁽⁴⁾	a ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	II ⁽³⁾	III ⁽⁴⁾	a ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	II ⁽³⁾	IV ⁽⁵⁾
1	1.51	1.22	1.13	1.99	0.50	0.59	0.46	0.71	0.52	0.66	0.43	0.77	0.71	0.66	0.47	0.80
2	1.92	1.58	1.15	1.67	0.48	0.50	0.43	0.69	0.52	0.56	0.44	0.71	0.81	0.75	0.49	0.66
3	1.97	1.63	1.24	1.59	0.49	0.65	0.34	0.62	0.51	0.65	0.35	0.65	0.84	0.74	0.50	0.69
連続培養 (3日) Continuous cultivation for 3 days	2.70	2.38	2.80	1.68	0.78	0.89	0.90	0.55	0.90	0.85	0.91	0.57	0.90	0.89	0.87	0.54
1	3.43	3.92	3.39	3.42	4.16	4.45	4.38	4.42	4.10	4.40	4.35	4.44	4.28	4.62	4.46	4.38
2	3.40	3.62	3.40	3.52	5.14	4.54	4.71	4.46	5.16	4.40	4.34	4.56	5.23	4.43	4.46	4.52
3	3.43	3.55	3.38	3.50	4.16	4.36	5.02	4.46	4.18	4.40	4.45	4.56	4.24	4.44	4.34	4.54
pH	連続培養 (3日) Continuous cultivation for 3 days															
	3.08	3.25	3.08	3.14	4.08	4.13	4.08	4.16	4.07	4.09	4.08	4.13	4.11	4.16	4.06	4.24

(1): a は従来の継代培養を示す
 a shows conventional culture
 (2): 矢野ら (1960)⁸⁾の方法による
 After Yano *et al.* (1960)⁸⁾
 (3): 森地ら (1964)³⁾の方法による
 After Morichi *et al.* (1964)³⁾
 (4): Özalp & Özalp (1979)⁶⁾の方法による
 After Özalp & Özalp (1979)⁶⁾
 (5): Yang & Sandine (1979)⁷⁾の方法による
 After Yang & Sandine (1979)⁷⁾

ましいように思われる。したがって本研究における集菌方法IIによって凍結乾燥し、 -20°C で凍結保存する方法を採用してゆくべきであると考えられる。

4. 試作試験

分析結果は以上のとおりであったが、集菌方法IIによって調製し9ヵ月凍結保存した凍結乾燥菌を復水懸濁液としたもの、および、対照の継代培養菌を用いて、それぞれ一たんスターを調製し、それを用いて常法¹⁾により、実際に発酵乳 (*Lb. bulgaricus* を使用) と固型ヨーグルト (*Lb. bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *Lb. acidophilus* を使用) を小規模に製造し比較した。その結果、製品は両者の間でまったく差は認められなかった。

したがって、今後なお凍結乾燥時の集菌方法と凍結乾燥菌株の水分含量、復水条件と生酸活性などの関係について検討を行う必要があると思われるが、利用上には問題はないと考えられるので、本研究の結果最も良いと考えられた集菌方法IIにより調製した菌株を -20°C に凍結保存する方式で、当面6ヵ月おきに更新しつつ保存する方法を採用してゆく予定である。

摘 要

本研究は鹿児島大学農学部畜産製造学研究室に以前より継代培養法で保存維持されてきた4種の乳酸菌 (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*) を凍結乾燥して保存した場合の実用性について調査した。

すなわち、既報の各種の方法の中から4種の方法を選んで各菌を凍結乾燥し、窒素ガスを封入して -20°C で1年間にわたり保存しつつその間定期的に生菌数と生酸活性とを測定調査したところ、そのうち、1%グルタミン酸ナトリウム溶液で集菌し凍結乾燥した、水分含量1.2%以下となったものが、生存率はやや低いが、生酸活性が旺盛で実用上有効であることが見出された。

また、この方法で調製した凍結乾燥菌を -20°C で9ヵ月保存した後に使用して、実際に発酵乳およびヨーグルトを製造したが、従来の継代培養菌を用いた場合とまったく変らない製品を製造することができた。

文 献

- 1) 鹿児島大学農学部畜産製造学研究室編 1972 牛乳の検査・分析法 33-34
- 2) 厚生省環境衛生局監修 食品衛生検査指針I 1973 日本食品衛生協会 東京
- 3) 森地敏樹・入江良三郎・矢野信礼・見坊寛 1964 畜試研報 6:111-116
- 4) _____ 1973 酪農科学・食品の研究 22:A 125-136
- 5) _____ 1983 同上 32:A 289-294
- 6) Özalp, E. and G. Özalp, 1979 Dairy Sci. Abst. 41:871-872
- 7) Yang, N. L. and W. E. Sandine, 1979 J. Dairy Sci. 62:908-915
- 8) 矢野信礼・森地敏樹・入江良三郎・見坊寛 1960 農化 34:1046-1049

Summary

This report is concerned with the survey of the practical utility made on lyophilization of four strains of lactic microorganisms (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lactis*), which have hitherto been held under conventional culturing in the authors' laboratory.

Those cultured strains were treated to be lyophilized by the four methods selected from those recommended in the papers already published, and they were sealed in N₂ gas and preserved in a frozen state (-20°C) for one year. During the preservation, viable cell count and survival percentage of the microorganisms were estimated after 0, 3, 6, 9, 12 months, respectively. After 9 months of preservation, acid producing activity was also determined.

The results showed that, when the cultures of those strains were treated with 1% of sodium glutamate solution and then were brought to be lyophilized, the maximal acid producing activity was maintained over 9 months or more, though the survival percentage became a little lower.

Manufacturing of fermented milk and yoghurt was actually tried, using the lyophilized cultures. From the results, it was confirmed that the products of the same quality as those by the conventional cultures could be manufactured by the lyophilized cultures.