

小売店で購入可能な食品および食品添加物を使用した 乳酸菌の培養培地の開発①

Development of the medium for culturing of lactic acid bacteria using only
commercial foods and food additives Part1

澤 渡 優 喜*

Yuki Sawatari

For the preparation of starter culture of lactic acid bacteria to ferment plant foods, based on MRS medium, I have developed FL medium-1 using only some commercial foods and a food additive. The FL medium-1 contains sugar, Marmite (edible yeast extract), cereal vinegar, lemon juice, tea drink and sodium carbonate. *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^T grew up to 2.8×10^9 CFU/mL from 2.7×10^7 CFU/mL in the FL medium-1 for 24 h of cultivation. When the culture of NBRC 15891^T was stored at 5°C for 7 days, viable cells of 15891^T was down to 61% compare with before storage. Therefore, in the further studies, I will improve the FL medium-1 to maintain viability of NBRC 15891^T in culture stored at 5 °C.

1. 緒論

乳酸菌はグルコースを消費して対糖50%以上の乳酸を生成する細菌のことであり¹⁾、ヨーグルト²⁾や漬物³⁾などの発酵食品の製造に関与している。乳酸菌で発酵した発酵食品は風味や保存性の向上だけではなく、含まれる乳酸菌の種類によっては整腸作用などのプロバイオティクス効果⁴⁾も期待することができる。前述のように、乳酸菌はヨーグルトなどの乳だけではなく漬物などの植物性食品の発酵にも関与する。植物性食品の種類が多いことから、植物性食品を乳酸菌で発酵することで多様な発酵食品の開発ができるものと期待している。そのためには、植物性発酵食品の開発に適する乳酸菌の培養培地が必要となる。

乳酸菌の培養にはMRS培地⁵⁾がよく使われるが、MRS培地は食用ではないためMRS培地で培養した乳酸菌の培養液を食品に直接添加することは安全面で不安が残る。そのため、食品製造に使用する乳酸菌の培養には食品や食品添加物を用いて調製した培地を使用すべきである。

食品である脱脂乳は代表的な乳酸菌を培養する培地である⁶⁾が、乳は発酵後、酸凝固をおこなうためその後の食品製造での使用に制限が生じる場合がある。一方、食品製造分野での使用を想定した乳酸菌の培地開発の報告^{7, 8)}があるが、培地調製に必要な培地原料は小売店で入手可

※ 健康栄養学科

小売店で購入可能な食品および食品添加物を使用した乳酸菌の培養培地の開発①

能なものばかりではなく大学の研究室での調製は困難となる場合がある。そこで本研究では、MRS培地の組成を参考に、小売店から入手可能な食品や食品添加物を原料とした培地開発の検討をキャベツの漬物から分離された*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^Tを供試菌株として行った。さらに、検討した培地で培養した培養液の保存性を把握するため、培養液を5℃保存した場合のNBRC 15891^Tの生残率も確認したので報告する。

2. 試薬と実験方法

供試菌株

独立行政法人 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター (NBRC, 千葉県木更津市) から入手した*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^Tを供試菌株とした。

試薬

M.R.S.ブイヨン(Oxoidのもの)、BCP加プレートカウント寒天培地‘栄研’は栄研化学(株)のものを、塩化ナトリウム、硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物およびポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート(ツイン80)はナカライテスク(株)のものを使用した。食品であるマーマイトはUnileverのものを、砂糖(白砂糖)は日新製糖(株)のものを、食酢(穀物酢)およびレモンジュース(濃縮還元、サンキスト100%レモン)は(株)ミツカン(株)のものを、および緑茶飲料(清涼飲料水、お〜いお茶 濃い茶)は(株)伊藤園(株)のものを使用した。食品添加物である炭酸ナトリウムは大洋製薬(株)のものを使用した。

培地調製

MRS培地はM.R.S.ブイヨンを使用して調製した。検討培地①は表1に示したようにMRS培地に使用されている試薬を可能な限り食品や食品添加物に代替して調製した。即ち、MRS培地の炭素源となるグルコースを砂糖に、窒素源、ミネラル源およびビタミン源となるペプトン、“ラブレムコ”末(牛肉エキス)ならびに酵母エキスを食用酵母エキスであるマーマイトに、酢酸ナトリウム三水和物を食酢にさらにクエン酸三アンモニウムをレモンジュースに代替した。検討培地②は検討培地①からツイン80を除いて調製した。検討培地③は検討培地①から硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物を除いて調製した。検討培地④は検討培地①から硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物およびツイン80を除き、硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物の代替として緑茶飲料を使用して調製した。全ての検討培地は滅菌後の培地pHが6.0~7.0になるよう炭酸ナトリウムで滅菌前の培地pHを6.1に調整した。BCP加プレートカウント寒天培地‘栄研’は滅菌後の温度を約50℃に調整した後に使用した。なお、培地の滅菌は全て121℃、15分の条件で行った。

小売店で購入可能な食品および食品添加物を使用した乳酸菌の培養培地の開発①

培養

スタブ培地で冷蔵保存してあるNBRC 15891^TをMRS培地に接種し、30℃で24時間培養した。これを前培養液とし、MRS培地および各検討培地に1% (v/v) 接種して30℃で24時間培養後、前培養に使用したMRS培地からの各検討培地への栄養素の持ち込みを減らすため、再度同培地に1% (v/v) 接種して30℃で24時間培養した。なお、全ての培養は静置で行った。

培養液の保存試験

培養液を5℃で7日間保存した。

生菌数測定

培養液を接種した直後の培地および培養液を滅菌済みの生理食塩水(0.85% (w/v) 塩化ナトリウム溶液)で段階希釈した。この希釈液をBCP加プレートカウント寒天培地‘栄研’で混釈後に室温で固化させ、30℃で3日間培養した。培養後、出現したコロニー数を計測し、生菌数を算出した。

pH測定

培地のpHはpHメーター (pH-22B (株堀場製作所)) で測定した。

表 1. 培地組成.

組成	MRS培地 ^{a)}	検討培地①	検討培地②	検討培地③	検討培地④ (FL培地-1)
	g/L				
グルコース	20.0	—	—	—	—
砂糖	—	20.0	20.0	20.0	20.0
ペプトン	10.0	—	—	—	—
“ラブレムコ”末	8.0	—	—	—	—
酵母エキス	4.0	—	—	—	—
マーマイト	—	50.8	50.8	50.8	50.8
酢酸ナトリウム三水和物	5.0	—	—	—	—
食酢	—	52.6 ^{d)}	52.6 ^{d)}	52.6 ^{d)}	52.6 ^{d)}
クエン酸三アンモニウム	2.0	—	—	—	—
レモンジュース	—	21.6 ^{d)}	21.6 ^{d)}	21.6 ^{d)}	21.6 ^{d)}
りん酸水素二カリウム	2.0	—	—	—	—
硫酸マグネシウム七水和物	0.2	—	—	—	—
硫酸マンガン四水和物	0.05	—	—	—	—
硫酸マンガン(II)五水和物 ^{b)}	—	0.054	0.054	—	—
緑茶飲料	—	—	—	—	700.0 ^{d)}
ソルビタンモノオレエート	1.0 ^{d)}	—	—	—	—
ポリオキシエチレンソルビタン モノオレエート (ツイン80) ^{c)}	—	1.0 ^{d)}	—	1.0 ^{d)}	—

- a) M.R.S.ブイヨンの培地ボトルに記載されている培地の組成。
- b) 硫酸マンガン四水和物の代替品。
- c) ソルビタンモノオレエートの代替品。
- d) 培地 1L に対して表記の分量を mL 単位で添加。

3. 結果と考察

検討培地①の組成の決定

表 1 に示した通り、検討培地①に使用する培地原料は MRS 培地に使用される原料を可能な限り小売店で入手できる食品や食品添加物に代替した。炭素源となる砂糖の添加量は MRS 培地に添加されるグルコースの量と同じ 20.0 g/L とした。窒素源、ミネラル源およびビタミン源として用いるマーマイトの添加量は MRS 培地中のペプトン、“ラブレムコ”末および酵母エキス由来のタンパク質量に近づけるため 50.8 g/L とした。酢酸ナトリウム三水和物およびクエン酸三アンモニウムは乳酸菌の増殖に伴う培地の酸性化を防ぐ緩衝剤として作用することが報告されている⁸⁾ため、酢酸を含む食酢およびクエン酸を含むレモンジュースに代替した。食酢の添加量は MRS 培地に添加される酢酸ナトリウム三水和物由来の酢酸量に近づけるため 52.6 mL/L とし、レモンジュースの添加量はクエン酸三アンモニウム由来のクエン酸量に近づけるため 21.6 mL/L とした。なお、本研究の供試菌株の種と同じ *L. plantarum* NRIC 0380 は酵母エキスを使用した培地ではりん酸水素ニカリウムおよび硫酸マグネシウム七水和物を増殖のためには要求しないことが報告されている⁸⁾ため、検討培地①には使用しなかった。一方、食品添加物としての使用が認められていない硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物および小売店での入手ができなかった食品添加物基準のツイン 80 は実験用試薬を使用した。

培養試験

MRS 培地および各検討培地で NBRC 15891^T を培養した結果を図 1 に示した。MRS 培地で NBRC 15891^T を培養すると生菌数は初発の 3.8×10^7 CFU/mL から 108 倍の 4.1×10^9 CFU/mL まで増加した。これに対し、検討培地①で NBRC 15891^T を培養すると生菌数は初発の 4.7×10^7 CFU/mL から 79 倍の 3.7×10^9 CFU/mL まで増加し、培養後の生菌数は MRS 培地で培養した場合の 9 割程度となった。このことより、培地の窒素源、ミネラル源およびビタミン源としたマーマイト、酢酸ナトリウム三水和物の代替とした食酢ならびにクエン酸三アンモニウムの代替としたレモンジュースが培地の代替原料として機能していると考えた。次に、検討培地①からツイン 80 を除いた検討培地②で NBRC 15891^T を培養したところ、初発の 3.4×10^7 CFU/mL から 94 倍の 3.2×10^9 CFU/mL まで増加し、生菌数は MRS 培地で培養した場合の 8 割程度となった。ツイン 80 は *Lactobacillus* 属細菌の増殖促進のために MRS 培地に添加される⁵⁾ オレイン酸を含む界面活性剤であるが、今回の培養試験の結果では増殖促進効果は確認されな

小売店で購入可能な食品および食品添加物を使用した乳酸菌の培養培地の開発①

かった。これは、MRS培地を用いた*L. plantarum*のツイン80の要求性試験の結果と同様である⁸⁾。ツイン80は食品添加物としての使用が認められているが小売店での入手は困難であり、また、オレイン酸を含む食用の乳化剤も存在するが、小売店からの入手は同じく困難である。これらのことより、ツイン80を培地に添加しないこととした。一方、検討培地①から食品添加物としての使用が認められていない硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物を除いた検討培地③でNBRC 15891^Tを培養すると生菌数は初発の 2.1×10^7 CFU/mLから42倍の 8.9×10^8 CFU/mLまで増加したが、生菌数はMRS培地で培養した場合の2割程度となり激減した。この増殖量の低下は培地に含まれるマンガンの量が少ないことが原因と考えられる。*L. plantarum*はスーパーオキシド(O₂⁻)の消去⁹⁾のため高濃度にマンガンを細胞内に蓄積する¹⁰⁾ことが報告されている。したがって、NBRC 15891^Tの増殖量を増やすためにはマンガンを何らかの食品から培地に供給する必要がある。マンガンを多く含む食品としてクローブや茶、シナモンがあげられるが¹¹⁾、これらの食品の中で茶は清涼飲料水として販売されており入手しやすいこと、さらに、緑茶中のマンガンが乳酸菌の増殖¹²⁾や発酵¹³⁾を促進することが報告されているため、硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物の代替として緑茶飲料を使用した検討培地④を調製した。なお、緑茶飲料から供給されるマンガンの濃度は食品データベース¹¹⁾の情報をもとに計算すると2.2~32.2 mg/Lと推定される。検討培地④でNBRC 15891^Tを培養したところ、初発の 2.7×10^7 CFU/mLから104倍の 2.8×10^9 CFU/mLまで増加した。培養後の生菌数はMRS培地で培養した場合の7割程度だが、検討培地③で培養した場合の約3倍まで増加した。したがって、既報^{12,13)}と同様に検討培地④の中で緑茶がNBRC 15891^Tの増殖を促進することが明らかとなった。以上の結果より、検討培地④で15891^Tを培養した後の生菌数はMRS培地で培養した後の同株の生菌数と比較するとやや低いが、培養前後の生菌数の増加がMRS培地で培養した場合と同程度の100倍以上であることより、小売店から入手可能な食品や食品添加物から調製した培地として検討培地④が使用できると判断し、FL培地-1と呼ぶことにした。今後、数種類の乳酸菌を用いた培養試験を行い、FL培地-1の汎用性を確認する予定である。

保存試験

各培養液を5℃で7日間保存した後のNBRC 15891^Tの生残率を図2に示した。MRS培地、検討培地①およびFL培地-1で培養したNBRC 15891^Tの生残率はそれぞれ、81%、91%および61%だった。FL培地-1は検討培地①から硫酸マンガン(Ⅱ)五水和物およびツイン80を除き、緑茶飲料を添加した培地である。そのため、これらの試薬や食品に含まれる成分が5℃保存中のNBRC 15891^Tの生残率の減少に関与していると考えている。ツイン80の代替品でありツイン80と同様にオレイン酸を含むスパン80(ソルビタンモノオレエート)を添加した培地で乳酸菌を培養すると、5℃保存下での生残性が上昇したとの報告がある¹⁴⁾。このことより、オ

レイニン酸が5℃保存下のNBRC 15891^Tの生残性に関与したものと考えられる。したがって、オレニン酸を何らかの方法でFL培地-1に添加することで、培養したNBRC 15891^Tの5℃保存下の生残率の低下を抑制できるものと期待される。今後、小売店で購入できる食品や食品添加物から、FL培地-1で培養したNBRC 15891^Tの生残率の低下を抑制するものを調べる予定である。

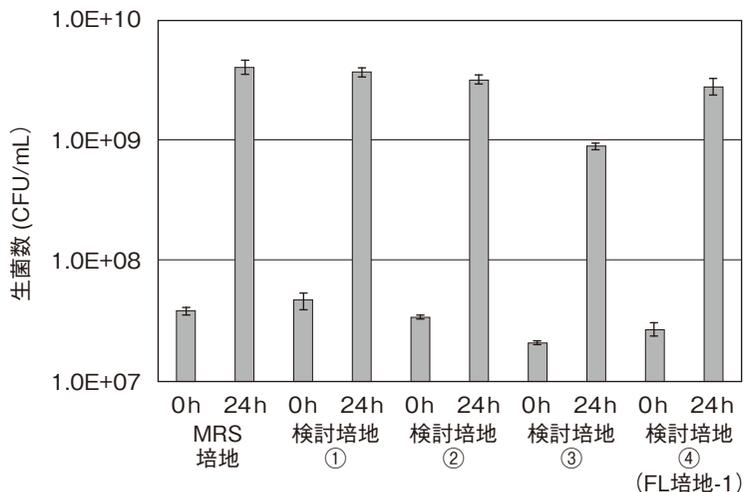


図1. 培養結果.

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* NBRC 15891^Tを各培地に接種した直後(0h)と培養24時間後(24h)の生菌数を棒グラフで示した。値は3回の独立試験の平均値である。

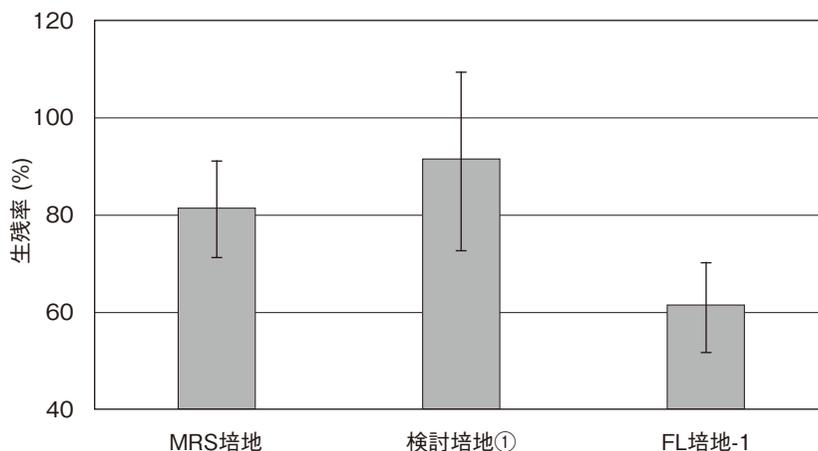


図2. 保存安定試験.

培養液を5℃で7日間保存後の*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^Tの生残率を示した。値は3回の独立試験の平均値である。生残率：生残率(%)=保存後の生菌数÷保存前の生菌数×100。

謝辞

この研究に協力頂いた郡山女子大学短期大学部 健康栄養学科の生田佳奈氏および吉田成海氏に感謝する。

参考文献

- 1) 日本乳酸菌学会編・岡田早苗, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 7-10頁, 京都大学学術出版会, 2010.
- 2) 日本乳酸菌学会編・木村勝紀、福井宗徳、佐々木泰子, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 367-375頁, 京都大学学術出版会, 2010.
- 3) 日本乳酸菌学会編・岡田早苗、遠藤明仁, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 396-400頁, 京都大学学術出版会, 2010.
- 4) 日本乳酸菌学会編・藤澤倫彦, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 495-502頁, 京都大学学術出版会, 2010.
- 5) De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E.: A medium for the cultivation of lactobacilli, *J. Appl. Bacteriol.*, 23, pp. 130-135, 1960.
- 6) 日本乳酸菌学会編・森地敏樹, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 593-599頁, 京都大学学術出版会, 2010.
- 7) Kasuga, G., Togashi, M., Abe, M., Tanaka, M., Arakawa, K., Kawai, Y., Miyamoto, T. and Masuda, T.: Development of an MRS broth-based complete food-grade medium for *Lactobacillus gasseri* cultivation using food-grade yeast extract and bacteriocins produced by the bacteria, *Milk Sci.*, 66, pp.195-204, 2017.
- 8) Sawatari, Y., Hirano, T. and Yokota, A.: Development of food grade media for the preparation of *Lactobacillus plantarum* starter culture, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 52, pp.349-356, 2006.
- 9) Archibald, F. S. and Fridovich, I.: Manganese and Defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.*, 145, pp.442-451, 1981.
- 10) Archibald, F. S. and Duong, M.-H.: Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.*, 158, pp.1-8, 1984.
- 11) 文部科学省, 食品成分ランキング, 食品成分データベース, <https://fooddb.mext.go.jp/ranking/ranking.html> (参照2020年1月21日).
- 12) Bureenok, S., Tamaki, M., Kawamoto, Y. and Nakada, T.: Additive effects of green tea on fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB) and the fermentative quality of rhodesgrass silage, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 20, pp.920-924, 2007.

- 13) 大塚製薬株式会社, 発酵生成物, 特開平11-4665.
- 14) Kaneko, T., Suzuki, H. and Takahashi, T.: Influences of cellular components and redox potential of liquid concentrated culture of *Lactobacillus bulgaricus* on acid-producing activity and viability, J. Dairy Sci., 70, pp.1128-1133, 1987.

以上