

小売店で購入可能な食品及び食品添加物を使用した 乳酸菌の培養培地の開発②

澤 渡 優 喜

(令和4年3月)

郡山女子大学紀要 第58集別冊

(Vol.58) PP.217～225

郡山女子大学 郡山市開成3丁目25番2号

小売店で購入可能な食品及び食品添加物を使用した 乳酸菌の培養培地の開発②

Development of the medium for culturing of lactic acid bacteria using only commercial foods
and food additives Part2

澤 渡 優 喜*

Yuki Sawatari

The previous study, I have developed the FL medium-1 to prepare the starter culture of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^T using only some commercial foods and a food additive. However, viable cells of NBRC 15891^T cultured in the FL medium-1 decreased at 5°C for 7 days storage. Therefore, I have tried to improve the FL medium-1 in order to maintain viable cells of NBRC 15891^T after storage at 5°C for 7 days. As a result, when NBRC 15891^T was cultured in FL medium-1 supplemented with a mayonnaise as a source of oleic acid, the viability of NBRC 15891^T tend to improve. Furthermore, I have confirmed that the flavor seasoning of *Hondasi* that can be purchased at any supermarkets can be used as a raw material for medium for culturing NBRC 15891^T.

1. 緒論

植物性食品を乳酸菌で発酵すると、様々な種類の発酵食品の開発が可能になると期待している。大学の研究室で乳酸菌を用いた食品の発酵試験を行う場合、乳酸菌スターターが必要となる。そのため、乳酸菌スターター調製用の乳酸菌の培養培地が必要となる。MRS 培地¹⁾は代表的な乳酸菌の培養培地だが、研究用途の培地であり食品用途ではない。実際、MRS 培地にはヒトに対する有害性リスクがある。例えば、MRS 培地には牛肉エキスが使用されている。牛肉エキスは BSE の伝染リスクがあるため、培地原料としての使用を避けるケースがある^{2, 3)}。また、MRS 培地に使用される硫酸マンガンには急性毒性等、複数の有害性が確認されている⁴⁾。したがって、MRS 培地を食用に使うことはできない。一方、食品製造分野での使用を想定した乳酸菌の培養培地がいくつか報告されている^{5, 6)} が、使用している培地原料は小売店で販売されているものばかりではなく、大学の研究室での調製が困難となる場合がある。そのため、食品としての安全性が認められ、誰でも購入できる培地原料を使用した培地開発を、キャベツの漬物から分離された *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891^T を供試菌株として試みた。その結果、スーパーマーケット等の小売店で購入できる食品及び食品添加物の

* 郡山女子大学短期大学部 健康栄養学科

みを使用した培地である FL 培地 -1 で NBRC 15891^T の培養が十分可能であることを確認した⁷⁾。しかし、数日間の保存安定性が望まれる培養した乳酸菌のスターターとしての使用期限を確認するため、FL 培地 -1 で培養した NBRC 15891^T を 5℃ で 7 日間保存し、生残率を調べたところ、生残率は著しく低下することが判明し⁷⁾、改善が必要であった。一方、前報の試験でオレイン酸を含む界面活性剤のツイン 80 に NBRC 15891^T の 5℃ 保存下の生残率を改善する効果を示唆する結果が得られている⁷⁾。また、ツイン 80 と同様にオレイン酸を含むスパン 80 を添加した培地で培養した乳酸菌は、5℃ 保存下の生残率が向上することが報告されている⁸⁾。そこで本研究では、FL 培地 -1 で培養した NBRC 15891^T の生残率の向上を目的とし、ツイン 80 又は水に分散するマヨネーズをオレイン酸の供給源として FL 培地 -1 に添加して NBRC 15891^T を培養し、5℃ で 7 日保存した後の生残率を確認したので報告する。また、FL 培地 -1 に窒素源、ミネラル及びビタミンの供給源として使用している食用酵母エキス（マーマイト）⁷⁾ は小売店に限られ容易に入手することができない。そこで、微生物の培養培地にも使用される酵母エキスやカツオエキス²⁾ を含み、スーパーマーケット等の小売店でも購入できる風味調味料及び減塩風味調味料の培地原料としての適性を培養試験と保存試験で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 *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum*（以前の種名は *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*）NBRC 15891^T を供試菌株とした。

試薬

M.R.S. プイオンは Oxoid のものを、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、塩化ナトリウム及びツイン 80 はナカライテスク(株)のものをを使用した。食用酵母エキス（マーマイト）は Unilever のものを、風味調味料（ほんだし）、減塩風味調味料（お塩控えめの・ほんだし）及びマヨネーズ（ピュアセレクト）は味の素(株)のものを、砂糖（白砂糖）は日新製糖(株)のものを、穀物酢（ミツカン穀物酢）及びレモンジュース（濃縮還元、サンキスト 100% レモン）は(株)ミツカンのものを並びに緑茶飲料（お〜いお茶 濃い茶）は(株)伊藤園のものをを使用した。食品添加物である炭酸ナトリウムは大洋製薬(株)のものをを使用した。

培地調製

MRS 培地は M.R.S. プイオンを使用して調製した。その他の培地は表に示した組成で調製した。なお、MRS 培地を除く全ての培地の pH が pH 6.0 ～ 7.5 になるよう炭酸ナトリウムで減

小売店で購入可能な食品及び食品添加物を使用した乳酸菌の培養培地の開発②

菌前の 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 45 ~ 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。

表. 培地組成.

組成	MRS培地 ^{a)}	FL培地-1	FL培地-1 + ツイン80	FL培地-1 + マヨネーズ (FL培地-2)	風味調味料 培地	減塩 風味調味料 培地
				g/L		
グルコース	20.0	-	-	-	-	-
砂糖	-	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
ペプトン	10.0	-	-	-	-	-
牛肉エキス (“ラブレムコ”末)	8.0	-	-	-	-	-
酵母エキス	4.0	-	-	-	-	-
食用酵母エキス (マーマイト)	-	50.8	50.8	50.8	-	-
風味調味料 (ほんだし)	-	-	-	-	63.9 ^{b)}	-
減塩風味調味料 (お塩控えめの・ほんだし)	-	-	-	-	-	52.3 ^{b)}
酢酸ナトリウム三水和物	5.0	-	-	-	-	-
穀物酢 (ミツカン穀物酢)	-	52.6 ^{c)}	52.6 ^{c)}	52.6 ^{c)}	52.6 ^{c)}	52.6 ^{c)}
クエン酸三アンモニウム	2.0	-	-	-	-	-
レモンジュース (濃縮還元、 サンキスト100%レモン)	-	21.6 ^{c)}	21.6 ^{c)}	21.6 ^{c)}	21.6 ^{c)}	21.6 ^{c)}
りん酸水素二カリウム	2.0	-	-	-	-	-
硫酸マグネシウム七水和物	0.20	-	-	-	-	-
硫酸マンガン四水和物	0.05	-	-	-	-	-
緑茶飲料 (お〜いお茶 濃い茶)	-	700.0 ^{c)}	700.0 ^{c)}	700.0 ^{c)}	700.0 ^{c)}	700.0 ^{c)}
ソルビタンモノオレエート (スパン80)	1.0 ^{c)}	-	-	-	-	-
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)	-	-	1.0 ^{c, d)}	-	-	-
マヨネーズ (ピュアセレクト)	-	-	-	0.6 ^{c, e)}	-	-

a) M.R.S. プイヨンの培地ボトルに記載されている培地の組成。

b) MRS 培地に含まれるタンパク質の量に近づけるための添加量。

c) 培地 1 L に対して表記の分量を mL 単位で添加。

d) NBRC 15891^T の 5℃、7 日間保存後の生残率の向上が期待できる量⁷⁾。蒸留水で希釈後に使用。

e) 1.0 mL/L の ツイン 80 に含まれるオレイン酸の量に近づけるための添加量。蒸留水で希釈、分散後に使用。

培養

MRS 培地で 30℃、24 時間の条件で培養した NBRC 15891^T を種菌とし、MRS 培地及び各検討培地に 1% (v/v) 接種して 30℃で 24 時間培養後、種菌培養に使用した MRS 培地から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

培養液を培地に接種した直後の培地又は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、出現したコロニーの数を計測し、生菌数を算出した。

pH測定

培地のpHはpHメーター（D-71（株堀場製作所））で測定した。

3. 結果と考察

5℃保存下のNBRC 15891^Tの生残率向上に対するツイン80又はマヨネーズ（ピュアセレクト）の効果検証

オレイン酸の供給源となるツイン80又はマヨネーズ（ピュアセレクト）を添加したFL培地-1でNBRC 15891^Tを培養し、5℃で7日間保存した後の生菌数を調べ、図1に示した。FL培地-1で培養したNBRC 15891^Tの生菌数は 1.2×10^9 CFU/mLであった。また、FL培地-1にツイン80又はマヨネーズを添加して培養したNBRC 15891^Tの生菌数はそれぞれ、 1.2×10^9 CFU/mL及び 1.3×10^9 CFU/mLであり、ツイン80及びマヨネーズによる生育阻害は観察されなく、問題なく培地に添加できることを確認した。これらの培養液を5℃で7日間保存した後のNBRC 15891^Tの生菌数は、それぞれ 9.5×10^8 CFU/mL、 1.1×10^9 CFU/mL及び 1.2×10^9 CFU/mLであった。また、図2に示した5℃保存後の生残率は、それぞれ、80%、89%及び93%であった。以上より、FL培地-1にツイン80又はマヨネーズを添加することで生残率が改善傾向にあることがわかった。ツイン80は食品添加物として認可されているが、スーパーマーケットなどでは購入できない。したがって、スーパーマーケットなどで容易に購入できるマヨネーズをオレイン酸源としてFL培地-1に添加することとした。なお、今後、本培地をFL培地-2と呼ぶこととした。

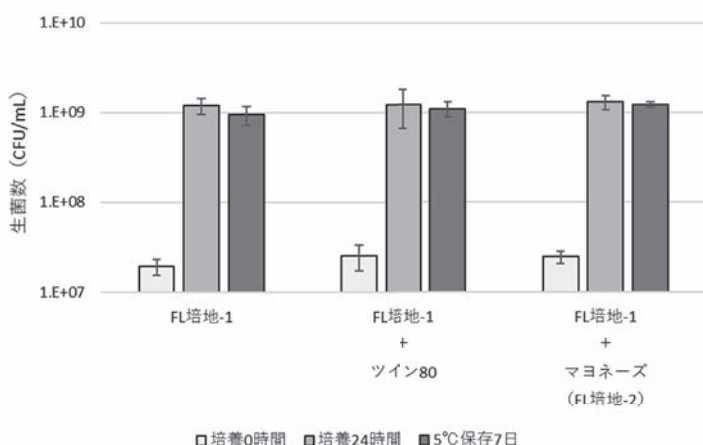


図 1. 培養試験及び保存試験の生菌数.

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* NBRC 15891^T を各培地に接種した直後（培養 0 時間）、培養 24 時間後（培養 24 時間）及び 5℃ で 7 日間保存後（5℃ 保存 7 日）の生菌数を棒グラフで示した。値は異なる 3 本の試験管で調製した培養液を用いて行った試験の平均値と標準偏差 (STDEV) である。

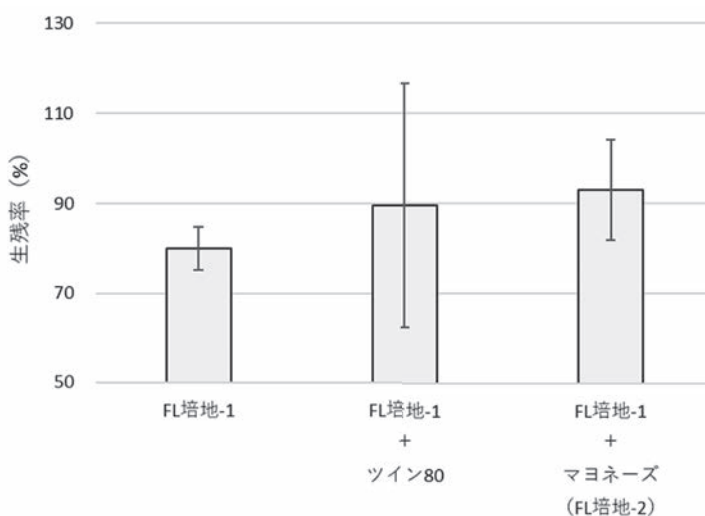


図 2. 5℃ 保存試験の生残率.

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* NBRC 15891^T の培養液を 5℃ で 7 日間保存後の生残率を棒グラフで示した。値は異なる 3 本の試験管で調製した培養液を用いて行った試験の平均値と標準偏差 (STDEV) である。生残率は、“生残率 (%) = 保存後の生菌数 ÷ 保存前の生菌数 × 100” で求めた。

風味調味料及び減塩風味調味料の培地原料としての適性確認試験① 培養試験

FL 培地 -1 に使用する食用酵母エキス（マーマイト）⁷⁾ の小売店が限られるため、スーパーマーケットで容易に購入できる風味調味料（ほんだし）及び減塩風味調味料（お塩控えめの・ほんだし）の培地原料としての適性を、MRS 培地を比較対象にした培養試験で確認し、結果を図 3 に示した。MRS 培地、風味調味料培地及び減塩風味調味料培地で培養した NBRC 15891^T の生菌数はそれぞれ、 5.4×10^9 CFU/mL、 1.4×10^9 CFU/mL 及び 1.9×10^9 CFU/mL であり、各風味調味料を使用した培地で培養した生菌数は MRS 培地で培養した生菌数の 3 割程度の生菌数であった。前報⁷⁾ では食用酵母エキスを使用した FL 培地 -1 で培養した NBRC 15891^T の生菌数は MRS 培地で培養した生菌数の 7 割程度と報告しているので、風味調味料又は減塩風味調味料を使用した培地は食用酵母エキスを使用した培地と比べ、NBRC 15891^T の培養の適性は低いものと考えられる。風味調味料を使用した培地が食用酵母エキスを使用した培地よりも培養の適性が低くなる原因は不明だが、例えば、*Lactobacillus plantarum* WCFS1 が増殖に要求するリボフラビン⁹⁾ に着目すると、FL 培地 -1 のリボフラビン量は風味調味料培地のリボフラビン量よりも高いことが、マーマイトの栄養成分値¹⁰⁾ とほんだしの栄養成分値は未公開のため参考とした顆粒和風だしの栄養成分値¹¹⁾ より推測された。このように培地に含まれるリボフラビンの量の差が NBRC 15891^T の増殖量に影響している可能性があると考えている。しかしながら、両風味調味料を使用した培地でも NBRC 15891^T を 10^9 CFU/mL 以上まで培養可能であること、また、24 時間の培養で風味調味料培地では約 70 倍、減塩風味調味料培地では約 100 倍まで生菌数が増加した（図 3）ことより、両風味調味料は NBRC 15891^T の培養培地として使用可能であると考えた。

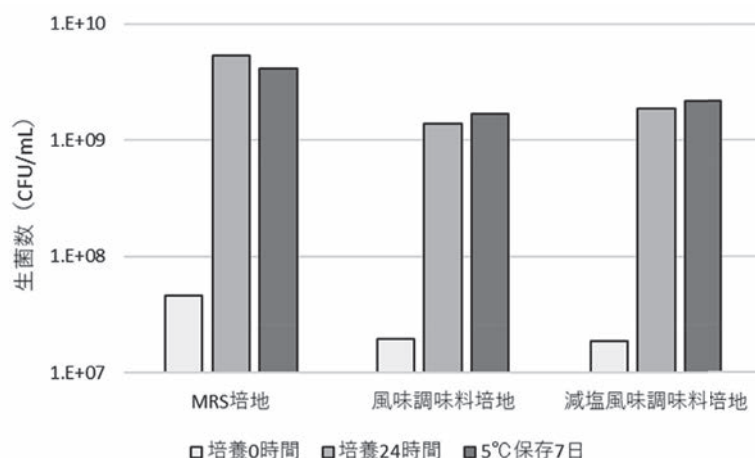


図 3. 培養試験及び保存試験の生菌数.

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* NBRC 15891^T を各培地に接種した直後（培養 0 時間）と培養 24 時間後（培養 24 時間）及び 5℃ で 7 日間保存後（5℃ 保存 7 日）の生菌数を棒グラフで示した。値は異なる 2 本の試験管で調製した培養液を用いて行った試験の平均値である。なお、培養 0 時間の生菌数は前培養液に含まれる生菌数を 100 で割ることで求めた値である。

風味調味料及び減塩風味調味料の培地原料としての適性確認試験② 5℃ 保存下の生残率の確認

MRS 培地、風味調味料培地及び減塩風味調味料培地で培養した NBRC 15891^T を 5℃ で 7 日間保存した後の生菌数はそれぞれ、 4.1×10^9 CFU/mL、 1.7×10^9 CFU/mL 及び 2.2×10^9 CFU/mL（図 3）であり、生残率では 76%、121% 及び 116% であった（図 4）。この結果より、風味調味料培地及び減塩風味調味料培地で培養した NBRC 15891^T は 5℃、7 日間の保存では生残率は低下しないことが分かった。したがって、風味調味料及び減塩風味調味料は FL 培地 -1 のようにオレイン酸源としてマヨネーズを添加しなくても NBRC 15891^T の培養培地として使用可能であると考えた。風味調味料培地で培養した NBRC 15891^T の 5℃ 保存下の生残率が低下しない原因は不明だが、風味調味料のほんだしの原料であるかつおぶし粉末やかつおエキス¹²⁾ は MRS 培地や FL 培地 -1 には含まれない原料であるため、NBRC 15891^T の生残率維持に寄与した可能性が考えられる。

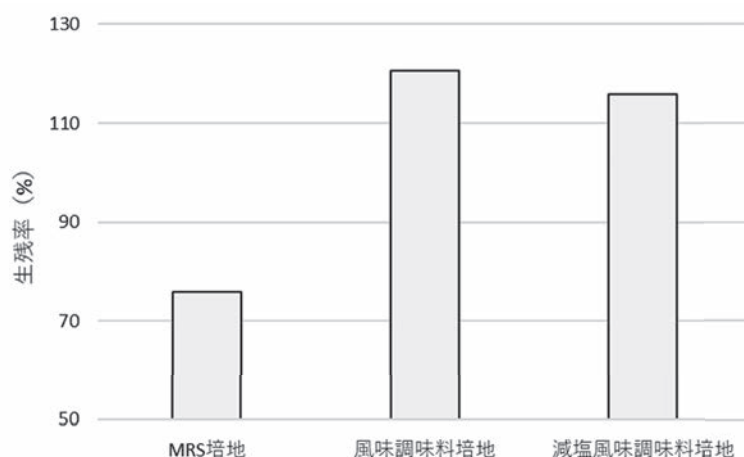


図 4. 5℃ 保存試験の生残率.

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* NBRC 15891^T の培養液を 5℃ で 7 日間保存した後の生残率を棒グラフで示した。値は異なる 2 本の試験管で調製した培養液を用いて行った試験の平均値である。生残率は“生残率 (%) = 保存後の生菌数 ÷ 保存前の生菌数 × 100”で求めた。

まとめ

本研究で、FL 培地-2、風味調味料培地及び減塩風味調味料培地を開発した。これらの培地は、スーパーマーケット等の小売店で購入できる食品や食品添加物のみを原料とするため、安全である。今後、これらの培地を用いて、NBRC 15891^T 以外の乳酸菌の培養試験を行い、開発した培地の汎用性を確認する。

利益相反の有無について

本研究発表に関連して、開示すべき利益相反関係にある組織等はない。

参考文献

- 1) 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.
- 2) 駒 大輔, 山中勇人, 森芳邦彦, 大本貴士 : 培地の成分知っていますか?, 生物工学会誌, 84, pp. 195-199, 2011.
- 3) サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, Oxoid peptone product (LP) Laboratory preparations and Biological Extracts, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/MBD0001-Pepton-1209.pdf>, 2021 年 11 月 29 日閲覧.
- 4) ナカライテスク株式会社, 安全データシート, 硫酸マンガン(II) 五水和物, <https://www.nacalai.co.jp/ss/ComDocs/Msds/PDF/2/GHS-21228-7.pdf>, 2021 年 11 月 29 日閲覧.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 澤渡優喜 : 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, 郡山女子大学紀要, 57, pp. 187-194, 2020.
- 8) 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.
- 9) Teusink, B., van Enkevort, F. H. J., Francke, C., Wiersma, A., Wegkamp, A., Smid, E. J. and Siezen, R. J. : In silico reconstruction of the metabolic pathways of *Lactobacillus plantarum*: comparing predictions of nutrient requirements with those from growth experiments, App. Environ. Microbiol., 71, pp. 7253-7262, 2005.
- 10) Unilever, MARMITE, NUTRITION INFORMATION, <https://www.marmite.co.uk/nutrition-information.html>, 2021 年 9 月 8 日閲覧.
- 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,

小売店で購入可能な食品及び食品添加物を使用した乳酸菌の培養培地の開発②

https://fooddb.mext.go.jp/details/details.pl?ITEM_NO=17_17028_7, 2021 年 9 月 8 日閲覧.

12) 味の素株式会社, ほんだし,

<https://www.ajinomoto.co.jp/products/detail/?ProductName=hondashi>, 2021 年 9 月 8 日閲覧.

以上