

地下水を用いた培地における乳酸菌の生育性評価

上野航介*・本田洋之*

論文要約

乳酸菌飲料等の製造における、乳酸菌の培養には工場が立地する地域の地下水を利用することが多く、研究に通常用いられる蒸留水とは水質が異なる。地下水の性質と乳酸菌の生育の関係を明らかにすることは、発酵生産の安定化に寄与すると考えられる。本研究では、北東北の様々な地域で採取した水を用いて *Lactiplantibacillus plantarum* および *Levilactobacillus brevis* の生育性を評価した。菌種によって生育は異なり、*Lv. brevis* は *Lp. plantarum* と比較して培養での濁度が低い傾向にあった。しかしながら、岩手県二戸市の愛宕の清水は *Lv. brevis* の生育を補足することが分かった。そこで、*Lv. brevis* の生育を向上する要因を探索したところ、 Mg^{2+} を含む培地では、*Lv. brevis* の濁度が有意に上昇した。一方、 Ca^{2+} および SiO_2 を含む水が生育に及ぼす影響は限定的であったが、これらの差異は地下水が通過した地質の違いによるものと推測される。

キーワード：地下水、乳酸菌、発酵、ミネラル

Growth of lactic acid bacteria in the culture media using groundwater

Kosuke UENO* and Hiroyuki HONDA*

ABSTRACT

In the production of lactic acid bacteria beverages, groundwater in the area where the factory is located is often used for the cultivation of lactic acid bacteria. The quality of the water is different from that of distilled water used for research. It would contribute to the stabilization of fermentation production to clarify the relationship between groundwater quality and growth of lactic acid bacteria. In this study, we evaluated the growth of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Levilactobacillus brevis* in groundwater collected from various areas in the north Tohoku region of Japan. Growth depended on the species; *Lv. brevis* exhibited a lower optical density at 660 nm in culture than *Lp. plantarum*. But the growth of *Lv. brevis* was compensated by Atago no Shimizu in Ninohe city. Therefore, we investigated the factors that enhanced the growth of *Lv. brevis*. The growth of *Lv. brevis* was significantly increased in the medium containing Mg^{2+} . On the other hand, the effect of Ca^{2+} and SiO_2 -containing water on the growth was limited, and these differences may be due to differences in the geology of the area through which the groundwater passed.

Keywords: groundwater, lactic acid bacteria, fermentation, mineral

令和2年12月 1日

*八戸工業大学工学部生命環境科学科

1. 緒言

乳酸菌は、乳、動物の消化管、植物など多種多様な場所に棲息する。中でも植物性の発酵食品から分離された乳酸菌が、近年乳酸菌飲料などの製品に用いられている。乳酸菌飲料やサプリメントの製造では、脱脂粉乳、糖液、濃縮果汁、または食品グレードの培地などを用いて乳酸菌を培養し、製造に用いている。それらの原材料の溶解・希釈においては、工場が立地する地域の地下から汲み上げた井戸水を用いることが多い。工業統計調査によると、処理牛乳・乳飲料製造業の工業用水における水源別の構成比は井戸水が79.4%で最も多く、次いで工業用水道が10.0%、上水道が8.2%となっている¹⁾。地中に浸透した水は地層に含まれる成分を溶解するため、地下水の水質は水が通過した地域の地質の状態を反映したものとなる²⁾。

日本酒の醸造においては、古くより地下水の地域性と製品の品質との関係性が知られており、兵庫・灘の宮水、京都・伏見の名水などの有名な水が存在する。醸造所の水のミネラル、とくに硬度と発酵の関係性について研究がなされており、醸造に使用する水の Ca^{2+} および Mg^{2+} が発酵を促進すること^{3,4)}が知られている。水には軟水や硬水という分類が存在し、WHOの基準では CaCO_3 換算の硬度が60 mg/L未満をsoft（軟水）、60–120 mg/Lをmoderately hard（中硬水）、120–180 mg/Lをhard（硬水）、180 mg/L以上をvery hard（超硬水）としている⁵⁾。この分類に当てはめると、日本では地域によって違いがあるものの軟水または中硬水に該当する水が多い^{6,7,8)}。一方、青森県から岩手県にまたがる南部地域の一部には、階上岳に降った雨が石灰岩の地層を通過するため、120 mg/Lを上回る硬度の水源が存在する⁹⁾。

通常の乳酸菌の研究においては、蒸留水を用いて培地を調製し実験を行う。一部の乳酸菌の発酵には、培地中の無機イオンが影響することが知られている。例えば、*Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1は Mg^{2+} および Mn^{2+} を要求すること¹⁰⁾、*Lactobacillus acidophilus*および*Lactocaseibacillus paracasei*の発酵は Mn^{2+} および Fe^{3+} によって促進されるが Mg^{2+} による影響は受けないこと¹¹⁾が知られている。*Pediococcus pentosaceus*では Mn^{2+} および Ca^{2+} により発酵におけるpHの低下が促進されることが報告されている¹²⁾。一方、*Lactobacillus helveticus*では Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} および Ca^{2+} などによる発酵促進の効果が認められない¹³⁾。これらのことから、菌種によって無機イオンの影響は異なると考えられる。実際の製造で使用される地下水には複数の成分が多様な濃度で溶解しており、研究に用いられる蒸留水とは水質が異なる。そのような地下水による乳酸菌の発酵への影響については、明確な知見がないのが現状である。地下水の性質と乳酸菌の生育との関係を明らかにすることは、発酵生産を安定化させることに寄与すると考えられる。

そこで、本研究では水の硬度が多様な北東北の南部地

域と周辺の地下水、および乳酸菌飲料に利用されている2菌種の乳酸菌を用いて生育評価を行った。さらに、地下水に含まれる生育促進因子について探索を行った。

2. 材料および方法

2.1 使用した水

青森県、岩手県、秋田県の計25か所の湧水を採取した (Fig. 1)。

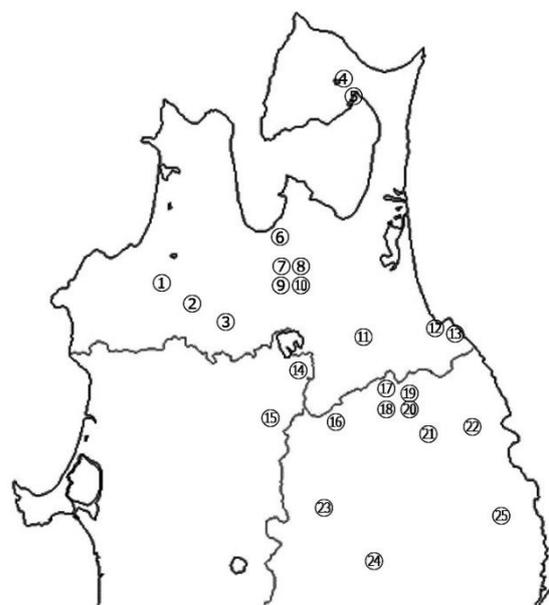


Fig. 1 Sites of sampled groundwater. 1, Iwakiyama shrine Gojinsui; 2, Tomita no Shitsuko; 3, Igami no Shitsuko; 4, Mt. Osorezan cold water; 5, Ominato springs; 6, Toyama Jinushi shrine spring; 7, Hakkoda spring; 8, Akakura spring; 9, Sukayu Onsen cold spring; 10, Yachi Onsen cold spring; 11, Matashige castle ruin water; 12, Mishima spring; 13, Shirahama Kannon spring; 14, Oyu Oshimizui; 15, Shimada well; 16, Ganshobo; 17, Gozensui Toi no Shimizu; 18, Atago no Shimizu; 19, Dake no Wakkutsu; 20, Sankyo spring; 21, Basho spring; 22, Furosen; 23, Kanazawa Shimizu; 24, Tataru Shimizu; 25, Ryusendo.

湧水の名称および採水地は以下の通りである：岩木山神社御神水¹⁴⁾ (弘前市)、富田の清水¹⁴⁾ (弘前市)、渾神の清水¹⁴⁾ (平川市)、恐山冷水¹⁵⁾ (むつ市)、大湊湧水群 (むつ市)、戸山地主神社の湧水 (青森市)、八甲田湧水 (青森市)、赤倉湧水 (青森市)、酸ヶ湯温泉の湧水 (青森市)、谷地温泉の湧水 (十和田市)、又重城址の水 (五戸町)、三島の湧水¹⁶⁾ (八戸市)、白浜観音湧水¹⁷⁾ (八戸市)、大湯大清水 (鹿角市)、島田井戸 (鹿角市)、岩誦坊 (二戸市)、御膳水・樋の清水 (二戸市)、愛宕の清水 (二戸市)、岳の湧口¹⁸⁾ (軽米町)、山居湧水 (二戸市)、芭蕉の泉¹⁸⁾ (九

戸村)、不老泉^{18,19)}(久慈市)、金沢清水^{18,20)}(八幡平市)、たたら清水(盛岡市)、龍泉洞¹⁸⁾(岩泉町)。湧水の採取時には、防水導電率計(CD-6021A、カスタム)を用いて、湧水の電気伝導率を測定した。採取した水はクーラーボックスに入れて持ち帰り、以後の試験に供した。なお、水の採取は雨の日を避けて実施した。

2.2 使用菌株、乳酸菌の培養、および生育評価

Lactiplantibacillus plantarum subsp. *plantarum* JCM1149^T (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149^T)、および *Levilactobacillus brevis* JCM1170 (*Lactobacillus brevis* JCM1170)は、DifcoTM Lactobacilli MRS Broth (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD)で2回継代培養(30°C、24時間)を行った。同培地の調製には蒸留水を用いた。次いで、half-strength MRS培地をベースにした改変MRS培地(Table 1)を用いて各菌株を培養し、生育評価を行った。すなわち、各試料の水を用いて作製した改変MRS培地5 mlに培養液100 µlを接種し、30°Cで24時間、静置培養を行った。培養終了後、濁度(OD 660 nm)とpHを測定し、生育を評価した。

Table 1 Components of modified MRS broth.

Component	Concentration (g/L)
Proteose peptone No.3	5.0
Yeast extract	2.5
Glucose	10.0
Sodium acetate	2.5
Dipotassium phosphate	1.0

2.3 生育曲線の解析

Lv. brevis JCM1170の経時的な生育を以下のように評価した。DifcoTM Lactobacilli MRS Brothで2回継代培養(30°C、24時間)を行った培養液200 µlをL字試験管内に調製した改変MRS培地10 mlに接種した。同培地の調製には、愛宕の清水、および対照として蒸留水を用いた。Bioscanner (OT-BS-12、大岳製作所、東京)を用いて30°Cで24時間振とう培養(30 rpm)を行い、濁度を経時的に測定・記録した。

2.4 無機成分を添加した培地での生育試験

Mg²⁺、Ca²⁺、およびSiO₂の濃度がそれぞれ0、0.01、0.1、1、10、100、1000 mg/Lとなるように、MgSO₄、CaCl₂、およびケイ酸四ナトリウムを添加して改変MRS培地を調製した。なお、ケイ酸四ナトリウムについては試薬の規格から、六水和物相当としてSiO₂濃度を算出した。これらの培地を用いて材料および方法2.2と同様に静置培養後の濁度を評価した。

2.5 統計解析

統計解析には R (the R Foundation for Statistical Computing) のユーザーインターフェイスである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、さいたま)を用いて行った²¹⁾。

3. 結果

3.1 使用した水の電気伝導率

採取した湧水に含まれる電解質(イオン)濃度の指標として、電気伝導率を測定した。その電気伝導率は26~289 µS/cmの範囲であり(Table 2)、三島の湧水、愛宕の清水、又重城址の水など、各地に電気伝導率の高い湧水が点在した。八甲田山周辺の湧水(谷地温泉の湧水、八甲田湧水、酸ヶ湯温泉の湧水、赤倉湧水)は電気伝導率が低い傾向にあった。

Table 2 Conductivity of groundwater.

Water	Conductivity (µS/cm)
Iwakiyama shrine Gojinsui	83
Tomita no Shitsuko	205
Igami no Shitsuko	93
Mt. Osorezan cold water	37
Ominato springs	65
Toyama Jinushi shrine spring	68
Hakkoda spring	36
Akakura spring	34
Sukayu Onsen cold spring	34
Yachi Onsen cold spring	40
Matashige castle ruin water	261
Mishima spring	289
Shirahama Kannon spring	121
Oyu Oshimizu	28
Shimada well	133
Ganshobo	64
Gozensui Toi no Shimizu	178
Atago no Shimizu	274
Dake no Wakkutsu	127
Sankyo spring	28
Basho spring	26
Furosen	113
Kanazawa Shimizu	89
Tatara Shimizu	61
Ryusendo	90

3.2 地下水を用いた培地における乳酸菌の生育

改変MRS培地における *Lp. plantarum* JCM1149^Tの

生育は*Lv. brevis* JCM1170よりも高かった (Fig. 2A)。一方、*Lv. brevis* JCM1170の濁度が最も高かったのは二戸市の愛宕の清水であった。培養後のpHについても同様に*Lp. plantarum* JCM1149^Tにおいて低かったが (Fig. 2B)、濁度とは異なり二戸市の水に他との差異は認められなかった。

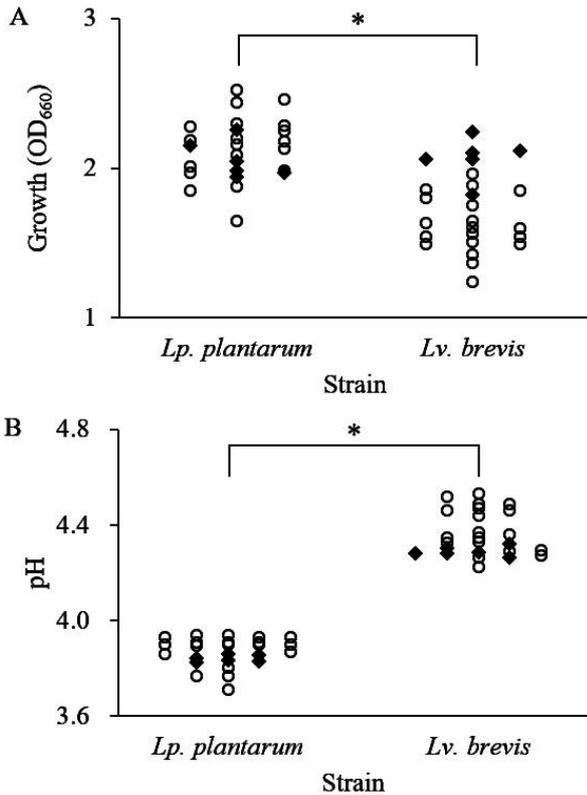


Fig. 2 Growth of *Lp. plantarum* JCM1149^T and *Lv. brevis* JCM1170 incubated in modified MRS broth using groundwater; (A) OD₆₆₀, (B) pH. ◆, Ninohe area; ○, the others. * $P < 0.001$, paired t -test (*Lp. plantarum* vs *Lv. brevis*).

3.3 二戸地域の地下水を用いた培地における乳酸菌の生育

地下水による*Lv. brevis*の生育促進効果を調べるために、前項で高い濁度を示した愛宕の清水を含む二戸地域 (二戸市、軽米町、九戸村) の湧水に着目して評価を行った。その中では、愛宕の清水のみ*Lv. brevis* JCM1170の培養後の濁度が*Lp. plantarum* JCM1149^Tを上回った (Fig. 3)。2つの菌株間の濁度差 (JCM1170の濁度 - JCM1149^Tの濁度) は、蒸留水と比べて愛宕の清水が有意に高く、正の値を示した (Table 3)。すなわち、愛宕の清水を用いた培地では*Lv. brevis* JCM1170の生育が促進されることが分かった。この現象は愛宕の清水に特異的であり、その他の二戸地域の水には認められなかった。

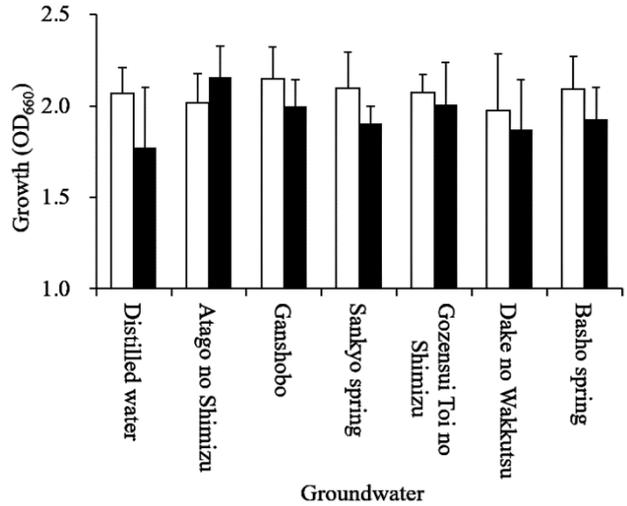


Fig. 3 Growth of *Lp. plantarum* JCM1149^T and *Lv. brevis* JCM1170 incubated in modified MRS broth using groundwater from Ninohe area and distilled water used as control. □, *Lp. plantarum* JCM1149^T; ■, *Lv. brevis* JCM1170. Data represent the mean values from three independent cultivations and standard deviation.

Table 3 Growth difference of *Lv. brevis* JCM1170 and *Lp. plantarum* JCM1149^T incubated in modified MRS broth using groundwater from Ninohe area and distilled water used as control.

Groundwater	ΔOD_{660}^{*1}
Distilled water	-0.30 ± 0.19
Atago no Shimizu	$0.14 \pm 0.02^{*2}$
Ganshobo	-0.15 ± 0.19
Sankyo spring	-0.20 ± 0.10
Gozensui Toi no Shimizu	-0.07 ± 0.18
Dake no Wakkutsu	-0.10 ± 0.27
Basho spring	-0.16 ± 0.05

Data represent the mean values from three independent cultivations and standard deviation.

*1, $\Delta OD_{660} = OD_{660} (JCM1170) - OD_{660} (JCM1149^T)$

*2, $P = 0.029$, Dunnett's test (vs Distilled water)

3.4 Lv. brevisの生育曲線

愛宕の清水、および蒸留水を用いた培地で*Lv. brevis* JCM1170の濁度を経時的にモニタリングした。その結果、2種類の水における最終的な到達濁度は同程度であったが、愛宕の清水における濁度上昇が蒸留水よりも早かった (Fig. 4)。

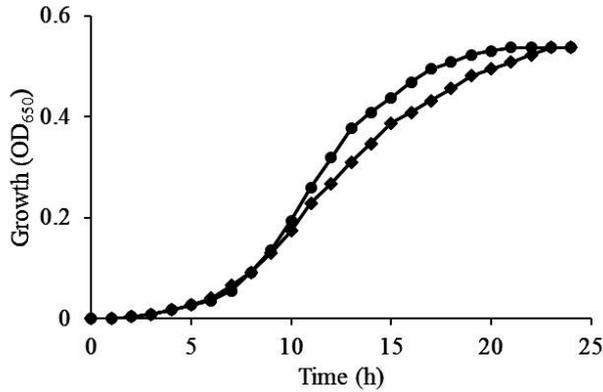


Fig. 4 Growth curve of *Lv. brevis* JCM1170 incubated in modified MRS broth at 30°C in shaking culture. ◆, Distilled water; ●, Atago no Shimizu. Fermentations were done in duplicate and a representative dataset is shown.

3.5 無機成分が乳酸菌の生育に与える影響

愛宕の清水に含まれる²²⁾とされている Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、および SiO_2 による *Lv. brevis* JCM1170 の生育促進効果を評価した。 Mg^{2+} 濃度が 10 mg/L、および 100 mg/L で有意に高い濁度を示した (Fig. 5A)。同様に Ca^{2+} および SiO_2 についても評価したが、これらの成分の添加による生育促進は認められなかった (Fig. 5B, 5C)。なお、 Ca^{2+} 濃度 1000 mg/L の培地では沈殿が生じたため、測定を行わなかった。以上より、 Mg^{2+} によって *Lv. brevis* の生育が促進されることが分かった。

4. 考察

本研究では、乳酸菌の培養における水の種類と生育の関係性について調べた。多くの湧水では乳酸菌の生育の程度は菌種によって異なり、*Lv. brevis*は*Lp. plantarum*より低い傾向にあった。しかしながら、二戸市の愛宕の清水は*Lv. brevis*の生育を補うことが分かった。生育の速度や菌体量は乳酸菌培養の生産効率に影響を及ぼすことから、愛宕の清水、およびその周辺地域の湧水に絞り*Lv. brevis*の生育を向上する要因を探ったところ、水に含まれる Mg^{2+} が要因の1つと考えられた。

湧水の分析結果から電気伝導率が高い傾向にあった愛宕の清水は、二戸市福岡の日本酒、南部美人の酒蔵の門前で湧出している。同酒蔵へのヒアリングによると、愛宕の清水は日本酒の仕込み水と同じ水源を持つ湧水である。この水は中硬水で、Ca、Mg、およびケイ酸を含むが、FeおよびMnは検出されないことが分かっている²²⁾。それらの成分を添加した培地での検討結果から、愛宕の清水による生育の促進には Mg^{2+} による影響が大きいことが示唆された。二戸地域の周辺にはMgを含む地質²³⁾が分布しており、愛宕の清水はその地質を通過した地下水に由来する可能性がある。乳酸菌における糖代謝関連の酵素には、 Mg^{2+} を要求する酵素や、 Mg^{2+} によって活性が

促進される酵素が複数存在する^{24,25,26,27)}ことから、*Lv. brevis*においても同様に、水に含まれる Mg^{2+} によってこれらの酵素の活性が高まり、生育性が向上した可能性がある。

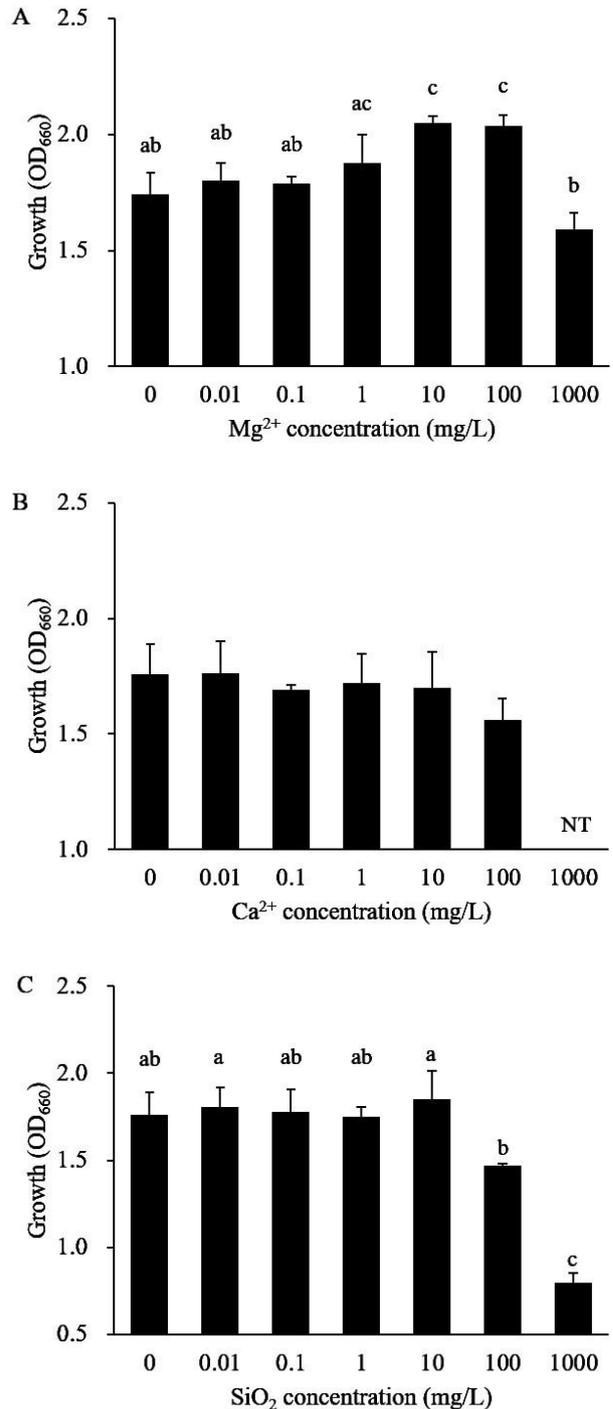


Fig. 5 Effect of inorganic compounds on the growth of *Lv. brevis* JCM1170 incubated in modified MRS broth: (A) Mg^{2+} , (B) Ca^{2+} , (C) SiO_2 . Data represent the mean values from three independent cultivations and standard deviation. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Tukey's test). NT, not tested.

八戸市周辺の地下水の中には、石灰岩 (CaCO_3) の地層²⁸⁾を通過することにより、硬度、とくに Ca^{2+} 濃度が高い水が存在する^{9, 29)}。しかし、本研究では Ca^{2+} による乳酸菌の生育促進効果は認められなかった。このことは、 Ca^{2+} が発酵に影響するとされている日本酒醸造との相違点である。三島の湧水、白浜観音湧水、および又重城址の水において、硬度の高さにも関わらず乳酸菌の生育が促進されなかったのは、 Mg^{2+} 濃度が低い¹⁶⁾ためと考えられる。一方、 Mn^{2+} は*Lp. plantarum*の生育に必須とされているが、愛宕の清水からは Mn^{2+} は検出されない²²⁾。生育に必要な Mn^{2+} 量は極めて微量と考えられること¹⁰⁾から、酵母エキスなどの培地成分にわずかに含まれる無機質が*Lp. plantarum*の生育に影響した可能性がある。

本報告では、植物由来の乳酸菌*Lv. brevis*の生育は使用する地下水の地域によって異なり、その違いの一端は Mg^{2+} によることを示した。この知見は、発酵生産に用いる地下水の性質に応じて、培地の栄養成分を補うことの必要性を示唆している。地下水に溶存するミネラル以外の因子については未だ明確ではなく、今後の検討課題である。

参考文献

- 1) 経済産業省. 工業統計調査 2019年確報 産業別統計表. 2020.
- 2) 綿抜邦彦. 水循環過程における水質の特徴. 日本地下水学会(編). 「続 名水を科学する」: 技報堂出版, 1999, 1-14.
- 3) 市川邦介, 前田嘉道. 清酒酵母の増殖, 発酸におよぼす無機塩類の効果 (第2報) 無機塩類の発酵における役割. 醸酵工学雑誌. 1963;41:538-542.
- 4) 佐々木慧, 古谷大輔, 竹野健次ほか. 軟水による米麹からの無機成分の溶出と清酒酵母の発酵能に与える影響および軟水醸造法における意義. 生物工学会誌. 2017;95:254-261.
- 5) WHO. Hardness in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 2011. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/hardness.pdf 2020年11月27日アクセス
- 6) 佐々木健. 名水の現状. 「水の特性と新しい利用技術 農業・食品・医療分野への応用」: エヌ・ティイー・エス, 2008, 286-297.
- 7) 日本地下水学会. 各名水の水質総括表. 日本地下水学会(編). 「新・名水を科学する-水質データからみた環境-」: 技報堂出版, 2009, 269-293.
- 8) 藪崎志穂, 島野安雄. 平成の名水百選の水質特性. 地下水学会誌. 2009;51:127-139.
- 9) 八戸圏域水道企業団. 平成 29 年度版水質年報. 2017;46.
- 10) Wegkamp A, Teusink B, de Vos WM, et al. Development of a minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. Lett Appl Microbiol. 2010;50:57-64.
- 11) 中嶋昭正, 吉開富士子. 無機塩類の乳酸菌の発育に及ぼす影響. 福岡女子短大紀要. 1981;22:11-19.
- 12) Raccach M. Method and bacterial compositions for fermenting meats. US patent. US.4303679. A (1981).
- 13) 平林照美, 佐藤一精. 乳酸菌 *Lactobacillus helveticus* B-1 による発酵乳生成の促進物質について. 日本家政学会誌. 1987;38:817-821.
- 14) 佐々木崇二. 名水を訪ねて(31)青森県の名水. 地下水学会誌. 1995;37:317-328.
- 15) グラフ青森. 「名水の旅 青森の水流を訪ねて」: 六ヶ所原燃PRセンター, 1994, 38-39.
- 16) 森和雄, 池田喜代治. 青森県八戸市および上北・下北一円の地下水について. 地質調査所月報. 1964;15:267-296.
- 17) 澤口驥三夫. 「ふるさと散策 義経伝説と湧水めぐり」: 八戸港湾運送, 2004, 84-85.
- 18) 長南里香. 「とうほく名水紀行」: 無明舎出版, 2000, 30-39.
- 19) 佐々木崇二. 名水を訪ねて(75)岩手県の名水. 地下水学会誌. 2006;48:297-310.
- 20) 板寺一洋, 島野安雄. 名水を訪ねて(22)・金沢清水と岩手山麓湧水群. 地下水学会誌. 1993;35:131-138.
- 21) Kanda Y. Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZ” (Easy R) for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 2013;48:452-458
- 22) 株式会社南部美人 HP <https://www.nanbubijin.co.jp/kodawari/water/> 2020年11月12日アクセス
- 23) 辻野匠, 工藤崇, 中江訓ほか. 一戸地域の地質. 地域地質研究報告 (5 万分の 1 地質図幅): 産総研地質調査総合センター, 2018.
- 24) Heath EC, Hurwitz J, Horecker BL, et al. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. J Biol Chem. 1958;231:1009-1029.
- 25) Lukacik P, Loble CM, Bumann M, et al. High-resolution structures of *Lactobacillus salivarius* transketolase in the presence and absence of thiamine pyrophosphate. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun. 2015;71:1327-1334.
- 26) Raghunathan K, Harris PT, Spurbeck RR, et al. Crystal structure of an efficacious gonococcal adherence inhibitor: An enolase from *Lacto-*

- Bacillus gasseri*. FEBS Lett. 2014;588:2212-2216.
- 27) Tittmann K. Reaction mechanisms of thiamin diphosphate enzymes: redox reactions. FEBS J. 2009;276:2454-2468.
- 28) 島口天. 青森県産の石材. 青森県立郷土館研究紀要. 2018;42:29-38.
- 29) 八戸地域地下水利用対策協議会, 学校法人八戸工業大学. 平成 29 年度八戸地域の地下水位及び地下水水質調査報告書, 2018.