

漬け物に含まれる乳酸菌の単離と酸性環境下での生育について

愛媛県立松山南高等学校 理数科 3年 山本伊吹 松下凜乃
岩崎 新 橘 優来
指導教員 山崎 涼

1 課題設定の理由

細菌類は私たちの生活を豊かにしてくれており、食品会社の取り扱う商品に多く組み込まれている。特に、植物性由来の乳酸菌の働きは注目を集めており、菌の力で健康の向上を図る「菌活」という言葉が女性を中心に広がり、腸内環境の改善、美肌効果などさまざまな効果が期待されている。

乳酸菌は、有機物を分解し、乳酸を生成する細菌の総称であるが、食物に含まれた状態で胃に達した乳酸菌が、胃酸で死滅しないことは不思議な現象である。

そこで、本研究では、漬け物などに含まれている植物性乳酸菌について、単離を試み、その形状や酸への耐性を調べることにした。

2 実験方法

(1)はじめに

本研究では、乳酸菌の単離に用いる培地を市販で売られている MRS 培地ではなく、身近な米ぬかから作成したオリジナル培地とし、乳酸菌を単離、培養する方法を試みることとした。

私たちは、漬け物の漬け汁から植物性乳酸菌を単離できると考えた。それに加えて、漬け物には様々な種類の乳酸菌が存在し、その種類の違いによって、生産する酸の量に違いがでてコロニーの大きさが異なることや、コロニーの形成までの時間が異なるということも考えた。乳酸菌の確認にはグラム染色法を用いることにした。

先行研究によると、乳酸菌は腸内を整える働きがあり、その働きは乳酸菌が死滅していても存続するが、生きていた方がその効果は高いと報告されている。

そこで、pH 調整試薬を用いた培地を使用して、オリジナル培地で単離した菌が胃酸と同じ pH でも生育可能か確認することにした。仮説として、先行研究によると多くの乳酸菌の最適 pH = 4 であることから、本研究で単離される乳酸菌の生育状態も pH = 4 が最も良く、したがって乳酸菌は胃酸の pH には耐えることが出来ないのではな

いかと考えた。

(2) 【実験 1】 乳酸菌の単離と培養

乳酸菌を単離するために、乳酸菌の発酵によって作られている漬け物を使用した。今回の実験では、なす漬けとたくあんの 2 種類の漬け物を使用した。

①蒸留水に米ぬかを 1%加え、3 分間 120℃でオートクレーブにかけてろ過し、この溶液にグルコース 1%、顆粒コンソメ 1%、炭酸カルシウム 0.5%、寒天 1.5%を攪拌しながら加える。本論文では、この溶液を米ぬか抽出液寒天培地、なす漬け、たくあんの漬け汁を菌液と呼ぶこととする。

②各菌液を 58℃に温め、液状にした米ぬか抽出液寒天培地に無菌的に混釈法で加えて 40℃で 2～3 日間培養する。

米ぬか抽出液寒天培地に含まれる炭酸カルシウムと乳酸菌の発酵によって産出される乳酸とが反応すると、水溶性の乳酸カルシウムができる。乳酸カルシウムは溶液中の水に溶け、コロニーの周りだけに透明なハローを形成する。この性質を利用してコロニーの形成を確認する。

③試験管内に液状の MRS 培地を流しこみ、保存用培地を調製する。本実験で形成されたコロニーは、熱処理した白金耳で採り、保存用培地に植菌する。

(3) 【実験 2】 グラム染色

グラム染色はグラム陽性菌とグラム陰性菌を見分ける染色で、グラム陽性菌は濃紫色に染まる。乳酸菌はグラム陽性菌にあたるので、染色をして濃紫色に染まれば乳酸菌である可能性が高い。

本研究では次のようにグラム染色を行った。

①1%グラム・クリスタルバイオレット染色液を、プレパラート上の乳酸菌を火炎固定した範囲を覆う程度加え、30 秒間染色する。

②2%ヨウ素液を加えたグラム・クリスタルバイオレット溶液を 1%グラム・クリスタルバイオレット溶液と同量程度加えて、30 秒間染色する。

③その後、脱イオン水で染色液をよく洗い流す。

④アセトン・エタノール溶液を固定した表面に加え、数秒間脱色する。

⑤その後、脱イオン水で洗い流す。

⑥ピオフィェル液を固定した表面を覆う程度加え、10 数秒間放置する。

- ⑦脱イオン水でよく洗い流した後、キムワイプで余分な水分を除き、固定表面を乾燥させる。
- ⑧顕微鏡を用い、接眼レンズ 15 倍、対物レンズ 100 倍で観察した。標準菌株と比較して、単離菌株の判定を行う。

(4) 【実験 3】酸性環境下での乳酸菌の生育

- ① 250mL の液体 MRS 培地を調製する。
- ②これを 4 つのビーカーに 50mL ずつ分注し、pH 調整試薬として水酸化ナトリウムまたは塩酸を加えることにより、pH1, 4, 7, 12 の選択圧培地を調製する。
- ③この 4 種類の選択圧培地を各 2 本の試験管に 15 mL ずつ流し込む。
- ④**実験 1** で保存した 2 種類の乳酸菌を各選択圧培地に 1 本ずつそれぞれ植菌し、40 °C で 2~3 日間培養する。
- ⑤その後、試験管中での乳酸菌の生育形態を観察し、記録する。

乳酸菌の育成形態は、懸濁・凝塊・表面生育の 3 つに区分した(表 1)。

なお、本実験では、米ぬか抽出液寒天培地を使用すると、この培地の白濁色と透明にぬけて見えるコロニー周辺の色との見分けが難しかったため、MRS 培地を使用した。

表 1 乳酸菌の生育形態

	区分	判定基準
1	懸濁	液体培地を振ると菌体が全体に拡散し、培地が濁る。
2	凝塊	菌体は凝塊を作って生育し、菌体は拡散せず培地は濁らない。
3	表面生育	液体培地の表面に皮膜を作って生育する。

凝塊



3 実験結果

米ぬか抽出液寒天培地に各菌液を植菌したところ、なす漬けとたくあんの両方の培地でコロニーが形成された（図1）。

なす漬け、たくあんの培地で、コロニー形成までの時間が異なった。それぞれ植菌してから、なす漬けは2～3日目、たくあんは5～6日目でコロニーが現れた。

同じ菌液から作成した培地を比較すると、それぞれの培地でコロニーが形成されるまでに時間差があった。どちらの菌もそれぞれの培地のコロニーの大きさにばらつきはなかった。

グラム染色では、なす漬けの漬け汁から単離した菌、たくあんの漬け汁から単離した菌ともに濃紫色に染まった（図2）。

なす漬けの漬け汁から単離した菌は丸い形をした球菌（Coccus）、たくあんの漬け汁から単離した菌は細長い形をした桿菌（Bacillus）であった。なす漬けの漬け汁から単離した菌をNC菌、たくあんの漬け汁から単離した菌をTB菌とする。

pHの異なる複数の培地に植菌した結果、TB菌は培養し始めてから2～3日後、pH4、7で生育（凝塊）が確認できた。同じ培養時間でTB菌のpH4、7で確認できた菌数はほぼ同量であった。NC菌は培養し始めてから7日後pH7のみ生育（凝塊）が確認できた（図3）。

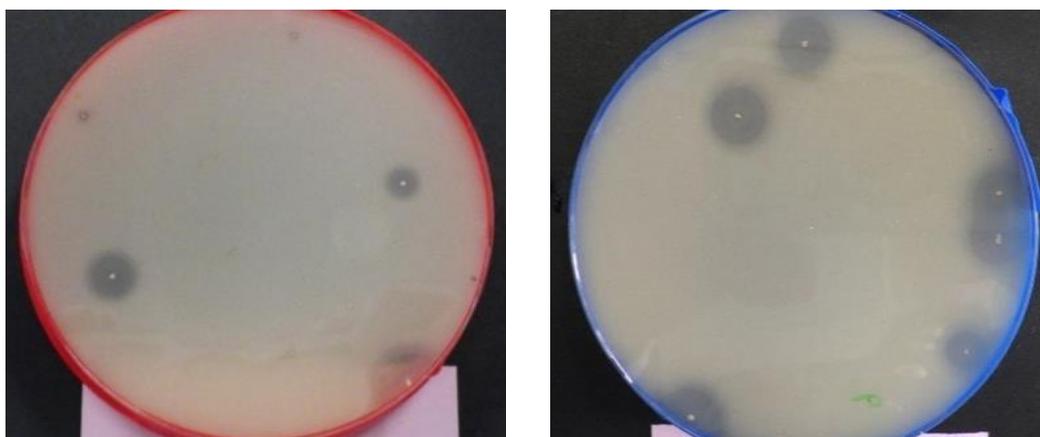
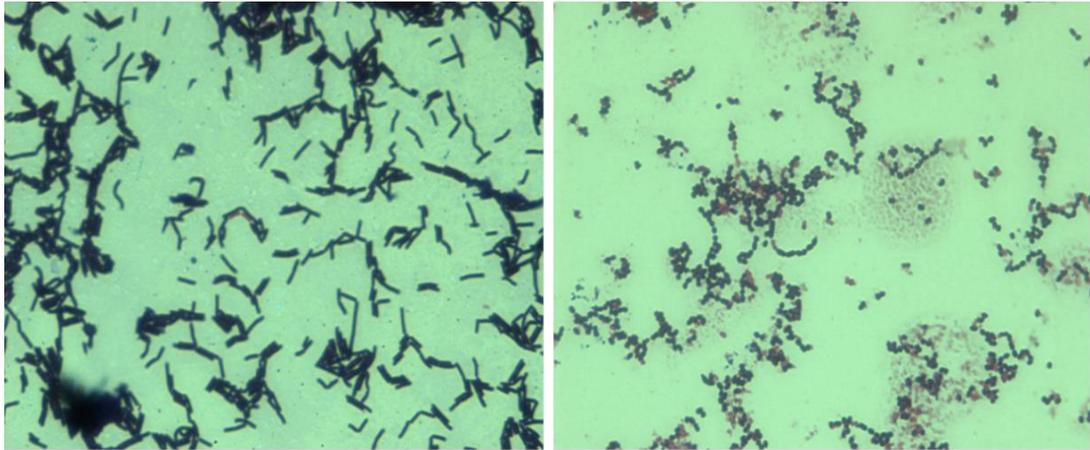


図1 培地に形成されたコロニー



T B 菌

N C 菌

図2 グラム染色をした細菌(×1500)

pH 1

pH 4

pH 7

pH12

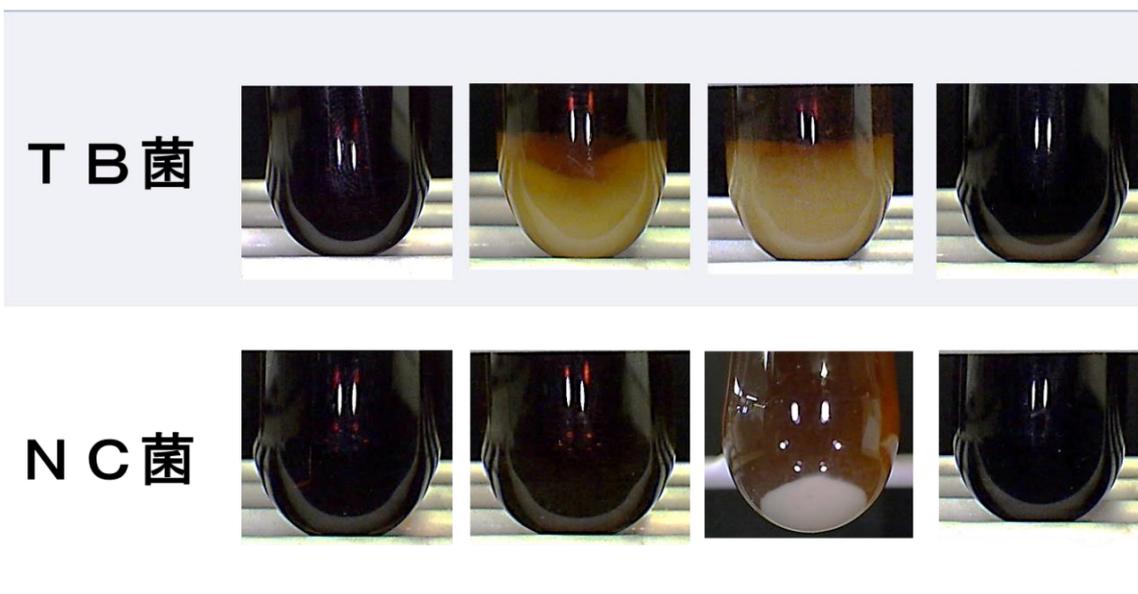


図3 pH耐性実験の結果

4 考察・今後の課題

発酵により作られる漬物には細菌が含まれており、その中に乳酸菌が含まれている可能性が高いと考えられる。異なる菌液を同じ培養時間で培養したところ、コロニーの形成までの時間が異なっていたため、漬物の種類によって存在する乳酸菌の種類が違ふ可能性が高いと考える。実験1によって、実験で使用したオリジナル培地は

乳酸菌の単離に使用できることが確認できた。**実験 1** で乳酸菌が実際に単離できるのか調べるために 1 つの培地から 1 つの菌株のみ取り出したが、今回の実験で単離できることが確認できたため、今後は単離する乳酸菌の菌株を増やす予定である。

発酵食品の菌液から単離した菌がグラム染色で濃紫色に染まったため NC 菌、TB 菌はどちらも乳酸菌である可能性が高く、細菌の形状が異なることから NC 菌、TB 菌は異なる種類の乳酸菌であると考えられる。ただ、今回単離した菌が乳酸菌であると断定するために、より専門的な手法により単離した細菌の同定を行う必要がある。

TB 菌と NC 菌の pH に対する耐性は異なり、NC 菌より TB 菌の方が pH に対する耐性は強い。また、今回の実験では食前の胃酸の pH である pH1 と食後の胃酸の pH である pH4 を設定したが、両方の菌が pH1 で生育を確認できなかったことから TB 菌や NC 菌は胃酸に耐えることはできないと考えるが、今回使用した選択圧培地は pH の幅が大きかったためその幅を細かくし再度検証する予定である。

また、単離した菌株からヒトの健康維持等に有効な菌株を探すために、乳酸菌が胃に届くまでに曝される pH 以外のヒト体内の諸条件を調べ、その条件と同様な選択圧を単離した菌にかけて生育を調べる必要がある。

実験 3 で NC 菌が乳酸菌の最適 pH である pH4 で発生しなかったことや、乳酸菌が生産する乳酸によって設定した pH がずれた可能性があることをふまえて、選択圧培地の作成方法を検討する。また、**実験 1** と **実験 3** において生育した菌数を明らかにするために、TB 菌と NC 菌のコロニーカウントを行う予定である。今後の実験で結果の正確性を上げるために、実験対象の漬け物の種類や実験回数を増やすことを検討している。

5 謝辞

本研究を行うにあたり、愛媛大学農学部生物資源学科応用生命科学専門教育コース阿野嘉孝先生には、終始丁寧にご指導をいただきました。この場をお借りしましてお礼申しあげます。

6 参考文献

- 小崎道雄, 乳酸菌実験マニュアル-分離から固定まで-, 朝倉書店, 1992
- 日本農芸化学会学術活動強化委員会, 土壌からの酵素生産微生物の分離 アミラーゼ・プロテアーゼ生産微生物の分離と検出 スーパーマーケットで調達できる培地成分
- (独)農研機構 畜産草地研究所, 鈴木チセ, 基本的な実験操作 食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作, 食品機能性評価マニュアル集第Ⅲ集, 社団法人日本食品科学工学会, 2008
- 愛知県産業技術研究所 食品工業技術センター, 植物性乳酸菌～私たちはこの身近な微生物と共に生きてきた～, 2006
- 東京農業大学 植物性乳酸菌 岡田教授, 生物応用化学科 岡田早苗教授の「植物性乳酸菌」 <http://www.nodai.ac.jp/research/teacher-column/pro-okada01/>
- 宮城大学食産業学部 木下英樹・井本瞬・須田義人・石田光晴, MRS 寒天培地と変法 LBS 寒天培地における乳酸菌の選択的単離能の比較, 2011
https://www.jstage.jst.go.jp/article/milk/60/3/60_171/_pdf/-char/ja
- 微生物学 実験入門 ヨーグルト菌の分離とコッホの原則
<http://www11.big.or.jp/~magmell/microbiology/p01.html>