

「万能乳酸菌」誕生への過程と課題の発見

3年B組 市瀬拓人

指導教諭 矢野幸洋

1. 要約

細菌のより有効な培養法や、細菌の性能向上を乳酸菌を用いて1から実験や研究をした。その結果、乳酸菌の長所や短所、および最も良い生育環境のための条件などが分かった。今後は、短所のない万能乳酸菌の製作を目指していきたい。

キーワード 乳酸菌、発酵、無酸素呼吸、乳酸、嫌気性細菌、乳酸桿菌、カタラーゼ反応、グラム染色法、ペプチドグリカン



乳酸菌桿菌モデル CG

2. 緒言

カルシウムを摂取する方法として代表的な例が、牛乳を飲むという方法が挙げられる。しかし、牛乳が嫌いな私にとっては、かなり苦痛である。そこで、乳製品を食べれば、カルシウムを摂取できると考えたため、このヨーグルトの研究を思いついた。

また、乳酸菌について調べると、乳酸菌は健康状態を良くしたり、重病を予防、改善することが分かった。主にヨーグルトに用いられている菌には、乳酸菌とビフィズス菌があり、乳酸菌は縦に長い形（桿菌という）をしており、ビフィズス菌はY字型をしている。今回は、この

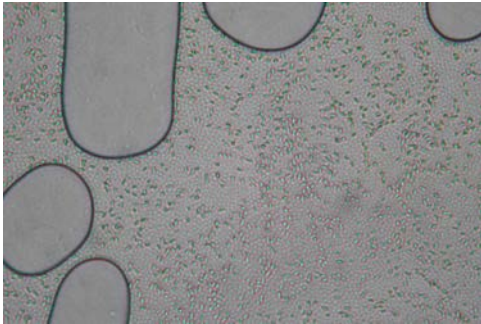
中の乳酸菌について研究をすることにした。乳酸菌は原核生物に分類され *Lb.casei*（カゼイ菌）などが有名である。乳酸菌も種類により様々な特徴があるが、全ての乳酸菌についていえることは、ペプチドグリカンと呼ばれる細菌特有の細胞壁が一般的な細菌よりも厚いという特徴である。これはグラム陰性とよばれる特徴である。

3. 目的

2つの目的のうちの1つは、細菌のより有効な培養条件や培地を見つけ出すことである。もう1つは、乳酸菌の短所を排除した「万能乳酸

菌の開発」である。これらのことが成功すると、細菌類を利用して病気を直したり、健康を維持していくことのできる方法の糸口が分かると考えている。

その目的達成のため、まず乳酸菌を確実に殖やす方法や条件を調べた。あわせて、乳酸菌の分類の位置づけや、そのグループの特徴についても調べる実験をした。



乳酸菌 L G 21 (光学顕微鏡にて)

4. 研究内容

<実験 I> ヨーグルトを作る

乳酸菌の特徴や最も良い生育環境の条件などを調べるために、以下の実験を行った。

(1) 仮説

ヨーグルトに含まれる乳酸菌は人間の腸にもともと生息しているため、人間の体温と同じくらいの約 37℃で活発に発酵を進めると思われる。

(2) 実験方法

- ① 滅菌した紙コップに市販のヨーグルトと牛乳を混ぜ、サランラップまたはガーゼで口の周りをおさえ、輪ゴムでとめた。
- ② a～dのようにヨーグルトと牛乳、または低脂肪乳を 1：5 の割合に混ぜる。
 - a. 市販のヨーグルトと牛乳
 - b. 市販のヨーグルトと低脂肪牛乳
 - c. 市販のヨーグルトから作った自家製のヨーグルトに牛乳を混ぜたもの
 - d. 牛乳だけのもの
- ③ 温度については、a は 4℃、常温 (約

25℃)、35℃、45℃の条件で行い、b、c、d については常温 (約 25℃) で行う。

- ④ 4 日目には pH についても測定する。
- ⑤ a～c については、始めはサランラップでふたをしていたが、水分がついたため、途中からガーゼに変えて実験した。

(3) 実験結果

実験の結果は次のとおりである。

表 1 ヨーグルトに混ぜるものの違い (常温)

月日	a	b	c
5月6日	実験開始	実験開始	実験開始
5月7日	おおむね固まった。	やや柔らかかった	やや固かった
5月8日	変化なし	変化なし	やや固まっていた
5月9日	変化なし	変化なし	かなり固まった
5月10日	固まった	やや固まった	固まった
5月11日	変化なし	大体固まった	変化なし
5月12日	変化なし	固まった	変化なし

表 2 温度による違い (a を用いる)

月日	4℃	35℃	45℃
5月6日	実験開始	実験開始	実験開始
5月7日	変化なし	チーズのようだった	やや固まった
5月8日	変化なし	刺激臭がした	—
5月9日	変化なし	水分がなくなった	—
5月10日	変化なし	処分	—
5月11日	変化なし	—	—
5月12日	変化なし	—	—

・pHについて

4日目の時点でのpHを以下のとおりである。

a. 牛乳+ヨーグルト（常温）：pH=4.5

d. 牛乳だけ：pH=4.8。

牛乳とヨーグルトの混合物の方が、酸度が高かった。

◎参考資料

○使用したヨーグルト

種類別 発酵乳

無脂乳固形分 11.5%

乳脂肪分 3.0%

原料名 乳製品、生乳、乳たんぱく質濃縮物

・栄養成分（100g）

エネルギー 70kcal

たんぱく質 5.0g

脂質 3.0g

炭水化物 5.8g

ナトリウム 48mg

カルシウム 160mg

○使用した牛乳

無脂乳固形分 8.3%以上

乳脂肪分 3.5%以上

原料名 生乳 100%

・栄養成分（100ml）

エネルギー 64kcal

たんぱく質 3.1g

脂質 3.6g

炭水化物 4.7g

ナトリウム 4.6mg

カルシウム 103mg

(4) 考察

温度が45℃のときや、4℃のときよりも、35℃のときの方が、発酵は早く進んだ。これについては、10℃以下になると乳酸菌の働きが止まるということが文献から分かった。つまり、人間の体温と同じくらいの温度で発酵が最も効率よく進んだといえる。

低脂肪牛乳を混ぜたものは、発酵が遅かった。牛乳は、置いていると悪臭がしたのに対し、ヨーグルトを混ぜると、まろやかな香りになった。

一方、サランラップでおおったものは、カビは発生しなかったのに対し、ガーゼでおおったものは発生したため、カビは、ヨーグルト自体から発生したのではなく、外から進入したものだと思われる。

市販されたヨーグルトを牛乳に混ぜてできたヨーグルトは、固まる速度が速かったため、乳酸菌の力が強くなっているかもしれないと考えられる。

<実験Ⅱ> 乳酸菌のDNAを抽出する。

今回は、ヨーグルトが本当に乳酸菌で発酵しているのか確かめるために、乳酸菌のDNAを抽出しようとした。対照実験として、ヨーグルト、牛乳、低脂肪牛乳でも同じ実験を行った。

(1) 実験方法

クロロホルム法を用いてDNA抽出を行った。

◎抽出方法

①TE20 バッファーは、0.5M Tris-HCl 10ml と0.5M EDTA 4mlに蒸留水 86mlを入れ、オートクレーブにかけた後、冷暗所に保存する。TE20 バッファーを20倍に薄めたものをTE1とする。

②試料を1.5mlチューブに入れ、TE20 バッファーを30μl加えてすりつぶす。

③TE20を170μl入れて混ぜた後、フリーザーにわずかの間入れる。

④クロロホルムを100μl加え、5分間振って混ぜる。

⑤5分間4℃で15000rpmで5分間遠心分離する。

⑥新しいエッペンチューブにガラスウールを少量(10-30mg)下方にまとめて入れ、⑤の上澄みを移す。

⑦3酢酸Naを20~30μlと冷エタノールを500μl入れゆっくり上下に回転させ、その後、フリーザーに3~5分静置させる。

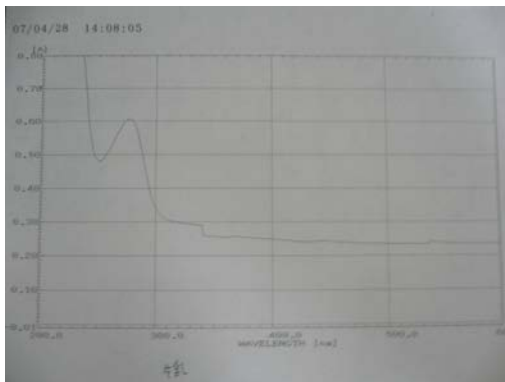
- ⑧遠心分離した後上澄みを捨てる。
- ⑨冷やした 70%エタノールで内壁を洗い、遠心分離後、上澄みのエタノールは捨てる。
- ⑩自然乾燥後、TE1 を 25 μ l 入れ、更に蒸留水を 125 μ l 入れ、65°Cのまま 5 分間保つ。
- ⑪新しいチューブに入れフリーザーに入れ保存する。ガラスウールは捨てる。ガラスウールにより DNA がより効率的に吸収できる。
- ⑫DNA の含まれた溶液を分光光度計にかける。

(2) 仮説

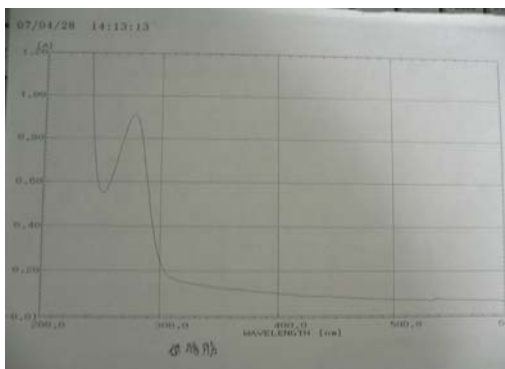
ヨーグルトには乳酸菌が含まれているため DNA があるが、牛乳と低脂肪牛乳には DNA が無いと思われる。

(3) 実験結果

分光光度計にかけ、分析した結果、牛乳と低脂肪牛乳の場合は 280 nm にピークが確認できたことよりタンパク質の存在が確認できた。DNA は無いと分かったが、ヨーグルトは何も確認できなかった。



分光光度計の結果（通常の牛乳）
ピークが 280nm にしか確認できないためタンパク質しか無いことが分かる



分光光度計の結果（低脂肪牛乳）
ピークが 280nm にしか確認できないため、

タンパク質しか無いことが分かる

(4) 考察

クロロホルムを用いて DNA 抽出を行ったが、DNA が確認できなかった。これはヨーグルトに含まれている DNA の量がかなり少ないからであろうと予測できる。

後日、乳酸菌のみについて簡易抽出法で抽出を何度も行った結果、わずかではあるが、DNA を目で確認することができた。おそらく、ヨーグルトで DNA 抽出を行った場合、乳酸菌の DNA 量に対して、ヨーグルト中に他のタンパク質などが多く含まれていたため、DNA の抽出が困難になったと思われる。

<実験Ⅲ> 乳酸菌を培養する

(1) 目的

前回の実験でヨーグルトを増やすことについては成功したものの、それが何の働きで行われているのかが不明なので無菌状態で乳酸菌のみを培養することにした。そこで、乳酸菌をプレート LB 培地で培養し、乳酸菌の集まったコロニーをこれからの実験に利用することにした。

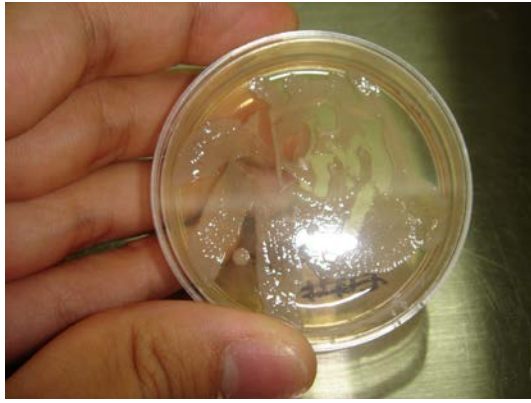
(2) 実験方法

まず、Luria-Bertani (LB 培地用試薬: Tryptone, Bacto 10g · Yeast extract, bacto 5g · NaCl 10g) と Agar, Powole (寒天粉末 1.5g) を計り取り、蒸留水を 100ml 入れ、よくかき混ぜたあとペトリ皿に入れ、オートブレイクにかける。よく冷めたら、クリーンベンチ内で白金耳でヨーグルト水を薄くぬる。1~2 日程おいておくとコロニーが出来る。

(3) 実験結果

大体のものは下の写真のように薄橙がかったコロニーができ、うまく培養できたといえる。





寒天培地 (LB 培地で培養した乳酸菌)

<実験Ⅳ> 乳酸菌ということを確認する[Ⅰ]

カタラーゼ反応

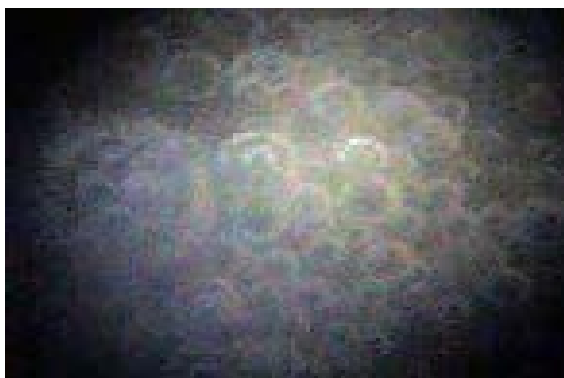
乳酸菌には他の細菌と違い、カタラーゼという物質が含まれていないのでカタラーゼ反応によりカタラーゼ陰性になるので、区別できる。

(1) 実験方法

培地で培養した乳酸菌のコロニーと思われるものを白金耳でかき集め、過酸化水素水にひたす。ここで酸素が発生すればカタラーゼ陽性(枯草菌類)となる。酸素が発生しなければ、カタラーゼ陰性(枯草菌類以外)となり、乳酸菌のグループであると分かる。

(2) 実験結果

あるお菓子に含まれている乳酸菌はカタラーゼ陽性だったが、それ以外の一般的なヨーグルト(プレーンヨーグルト)では、カタラーゼ陰性だった。



枯草菌類と過酸化水素水での反応

(カタラーゼ反応・陽性)

(3) 考察

カタラーゼ陽性だったお菓子に入っている乳酸菌は、普通の乳酸菌とは違い、分裂ではなく孢子で増える「バチルス・コアグラス」という乳酸菌が含まれていることが分かったため、さらに詳しく研究する。

<実験Ⅴ> 乳酸菌ということを確認する[Ⅱ]

グラム染色法

細菌類は主にグラム染色法という染色で2つの種類に分けることができ、その例としてグラム陽性が枯草菌類、グラム陰性が大腸菌類があげられる。これらの細菌の違いは、細菌の細胞の表面を覆っているペプチドグリカンといわれる物質の厚みで区別されている。つまり、このペプチドグリカンが厚ければグラム染色法で染めた後、アルコールで洗浄しても染色液が抜けないが、ペプチドグリカンが薄ければグラム染色法で染めた後、アルコールで洗浄した際に染色液が抜けてしまうという仕組みである。

(1) 実験方法

・使用薬品

ルゴール(Lugol)液: ヨウ素 1g, ヨウ素カリウム 2g, 蒸留水 300ml (先ずヨウ素カリウムを少量の蒸留水に溶かし、次にヨウ素液を加え、溶かしてから残りの蒸留水を加える。)

A液: クリスタルバイオレット 0.3g, 95% エタノール 20ml

B液: シュウ酸アンモニウム 0.8g, 蒸留水 80ml

混合液: 前日にA液とB液を混合し、使用当日に濾過する。

・染色方法

(1) スライドガラスに白金耳で蒸留水を1滴と菌をいれ、よく伸ばす。

(2) 乾かす

(3) ガスバーナーの上を3回ほど通す。

(固定)

(4) 染色用混合液を1滴、滴下する。(1～

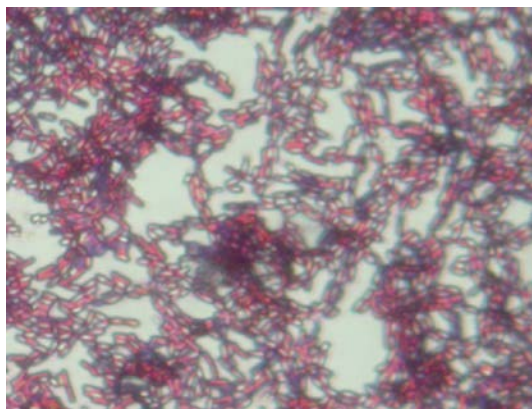
3分)

- (5) 染色トレーで洗う。(2回)
- (6) 乾かす。
- (7) ルゴール液を1滴、滴下する。(1分)
- (8) 染色トレーで洗う。(2回)
- (9) 乾かす。
- (10) エタノールを1滴、滴下する。(30秒)
- (11) 染色トレーで洗う。(2回)
- (12) 乾かす。
- (13) サフラニン液を1滴、滴下する。(1分)
- (14) 染色トレーで洗う。(2回)
- (15) 完全に乾かす。
- (16) 顕微鏡で観察する。

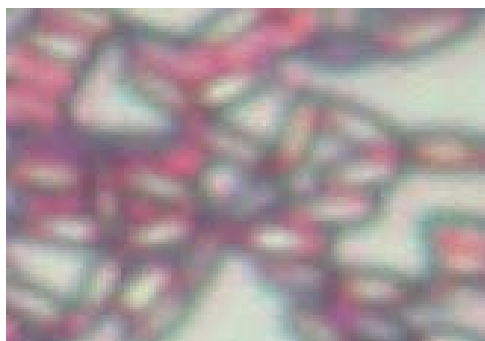
※ これについて染色時間を1分、2分、3分とかえて実施し、合計15種類を実施した。

(2) 実験結果

プレパラート15枚中13枚の乳酸菌の細胞壁(ペプチドグリカン)が紅色やうすい黒色に染まった。



グラム染色法により染まった乳酸菌



楕円形に見える一つずつがペプチドグリカンの染まった乳酸菌

(3) 考察

グラム染色法で乳酸菌が染まったので、枯草菌類と同じグループに分類され、乳酸菌のペプチドグリカンは厚いということが分かる。

<実験VI>

ヨーグルトの養分を利用した培養法

前回の実験Iでカビが発生した事を利用して、ヨーグルト水で植物を育てた場合と、通常の水で育てた場合の比較実験を行った。

(1) 仮説

普通の水で植物を育てた場合より、カビが育ちやすかったヨーグルトの養分が入っているものの方が植物は効率よく育つと考えられる。

(2) 実験方法

同じ種類の植物を、同じ条件で、通常の水で育てる場合：Aと、ヨーグルトを溶かした水で育てる場合：Bを製作して育てる。



(3) 実験結果

通常の水で育てた場合：Aより、ヨーグルトを溶かした水で育てた場合：Bの方が3日間ほど長く生育できた。

(4) 考察

ヨーグルトには、ヨーグルトの乳酸菌か牛乳のどちらかは分からないが、養分が蓄えられていることが分かったが、しかし、これが乳酸菌の働きによるものであるかは分からない。

<実験Ⅶ> 無酸素状態で乳酸菌を培養する

乳酸菌は、嫌気呼吸を利用する嫌気性通気菌のため、酸素が無い状態の方が育ちやすいという仮説をたて、次のような実験をした。

(1) 実験方法

密閉容器（すりきりの付いた容器）に乳酸菌をまいた LB 培地を入れ、その中に水の電気分解で発生させた水素を満たして培養した。

(2) 実験結果

通常の空气中で培養したもののように薄橙色のコロニーが複数個でき、見た目の変化は無かった。

(3) 考察

嫌気性呼吸とはただ酸素が必要ないというものであって、酸素が無いからといって元気になったり成長が速くなったりするものではないといえる。

<実験Ⅷ> 乳酸菌でダイズを発酵させる

この実験は、納豆が嫌いな人のために納豆菌を使わずに、乳酸菌で発酵させるという実験である。

(1) 実験方法

実験Ⅲで製作したコロニーの上にダイズを載せる方法を A とし、ヨーグルトの中にダイズを入れたものを B とした。

(2) 仮説

ダイズには乳酸菌が発酵をするために必要なガラクトースという糖が含まれていないため発酵しないと思われる。

(3) 結果

A, B ともに発酵しなかった。

(4) 考察

仮説の通り、乳酸菌は、大豆を発酵させなかった。理由がわからないため、これから調べていきたい。

5. まとめと今後の課題

今回の様々な実験を通して乳酸菌の基礎

から応用までの様々なことを学ぶことができた。今回、分かったことをまとめると、以下のとおりである。

- (1) 乳酸菌の生育に最も関わる条件は、温度で、最もよく（早く）生育する温度は 37℃（人間の体温と同じくらい）であり、10℃以下では生育が止まるということ。
- (2) 乳酸菌には何らかの養分があるということ。
- (3) 乳酸菌は培養した際、コロニー（集団）を作るということ。
- (4) 乳酸菌は何らかの特定の物質を持っているものにしか働かず、その物質を持っていないければその個体を発酵させないということ。
- (5) 乳酸菌の DNA はとても少なく、抽出が困難であるということ。
- (6) 乳酸菌には、分裂して増えるものと孢子で増えるものがあり、それは、カタラーゼ反応で区別できるということ。
- (7) 嫌気性呼吸を利用している嫌気性通気菌は、酸素を嫌うのではなく、酸素を利用しない菌であるということ。
- (8) 細菌は主にグラム染色法で二種類に分けられ、それは、ペプチドグリカンの厚みで区別できるということ。

次に、今後の課題としたいのは、孢子で増える乳酸菌があるので、コケのように孢子で増える植物と組み合わせることができるようにして、より強い乳酸菌を作ることである。

また、乳酸菌が働く特定の物質の解明や、より正確な DNA 抽出方法の開発なども今後の課題としたい。より適切な方法で、実験・研究を進めていこうと思う。

6. 参考文献・参考資料

- ・ダイナミックワイド「図解生物」 東京書籍
- ・ヨーグルトの科学
- ・遺伝工学実験ノート DNA を得る

- ・2007年 公開講座 実験試料
- ・明治乳業 HP
- ・グリコ乳業 HP
- ・建部ヨーグルト HP
- ・社団法人 全国日本発酵乳乳酸菌飲料協会発酵乳、乳酸菌飲料公正取引協議会 HP
- ・信州大学農学部 細野明義教授 HP
- ・京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 岸野、小川、清水さん論文
- ・生物学辞典 岩波文庫

7 謝辞

今回の研究では株式会社グリコ乳業 発酵乳Gの瀧澤さんに様々な実験方法について、適切なアドバイス等をいただき、研究の大きな手助けをしていただいたことに、大変感謝しております。

また、今回の研究において、特に貴重なご助言をして下さり、グラム染色法で指導して下さった本校教諭の櫻井先生にも、深く感謝しております。ありがとうございました。