

市販発酵乳生産菌のプロバイオティクス性に関する研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

北村 夢風 坂原 一夏 喜納 明日華

1. 研究の目的

近年、健康を維持する上で腸がとても大切な役割を果たしていることに注目が集まっている。“腸まで届く乳酸菌”“生きて届くビフィズス菌”これらのキャッチフレーズをよくみかける。日常的に食するヨーグルトなどの発酵乳の健康効果について調べたいと思った。スーパーなどで入手できる発酵乳（乳酸菌やビフィズス菌含有）から発酵乳生産菌の分離を行い、人工胃液耐性試験を試みた。結果を報告する。

2. 発酵乳から生産菌の分離

1) 材料：市販発酵乳（9種類）

1. 明治ブルガリア(明治乳業) 2. LG21 (明治乳業) 3. 森永ビフィダス (森永乳業) 4. ソフール(ヤクルト) 5. ダノンバイオ(ダノン) 6. カスピ海ヨーグルト(フジッコ) 7. 恵ガセリ(雪印メグミルク) 8. R1 (明治乳業) 9. ビフィックス(グリコ)



2) 分離の方法と結果

発酵乳 1g を滅菌生理食塩水に溶いた。10⁶ 倍に希釈した液を専用培地に塗抹し 37℃で 3 日間、嫌気培養を行った。乳酸菌(1, 2, 4, 6, 7, 8) 用は BCP 寒天培地、ビフィズス菌(3, 5, 9) 用は TOS プロピオン酸寒天培地を使用した(図 1)。

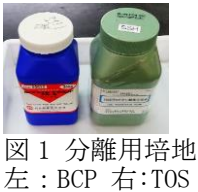


図 1 分離用培地 左:BCP 右:TOS

各培地上には 10~50 個のコロニーが生育し、単コロニーを分離することができた(図 2)。

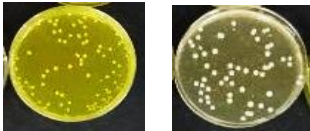


図 2 発酵乳生産菌コロニー (例-左:ソフール 右:ダノンバイオ)

3. 分離した発酵乳生産菌細胞の観察

分離した発酵乳生産菌コロニーから試料を作成し、生物顕微鏡で細胞観察を試みた。プレパラートを生物顕微鏡にセットし、低倍率(黄色-対物)で焦点をあわせ、高倍率(×900)で観察し細胞形を確認した。接眼ミクロメータ 1 目盛を 1.3μm として細胞の大きさ(長径×短径)を計算しその結果を表 1 にまとめた。

表 1 発酵乳生産菌の生物顕微鏡細胞観察(×900)

分離コロニーNo. 分離源	コロニー形	細胞形	細胞スケール(μm)	微生物想定
1 明治ブルガリア	丸	連鎖状球菌	1.3×1.0	乳酸菌
2 LG21	丸	連鎖状球菌	1.3×1.0	乳酸菌
3 森永ビフィダス	不定形	変形桿菌	3.9×1.0	ビフィズス菌
4 ソフール	丸	桿菌	4.0×1.0	乳酸菌
5 ダノンバイオ	丸	変形桿菌	2.6×1.0	ビフィズス菌
6 カスピ海ヨーグルト	丸	球菌	2.5×1.3	乳酸菌
7 恵ガセリ	丸	桿菌	4.0×1.3	乳酸菌
8-1 R1	不定形	長桿菌	>5×1.0	乳酸菌
8-2 R1	丸	短桿菌	2.0×1.0	乳酸菌
9 ビフィックス	丸	変形桿菌	4.9×1.3	ビフィズス菌

細胞形を拡大してさらに詳しく調べるために走査電子顕微鏡(SU1510) 1~2 万倍で観察し、細胞形状の確認、スケールの計測をおこなった(図 3)。

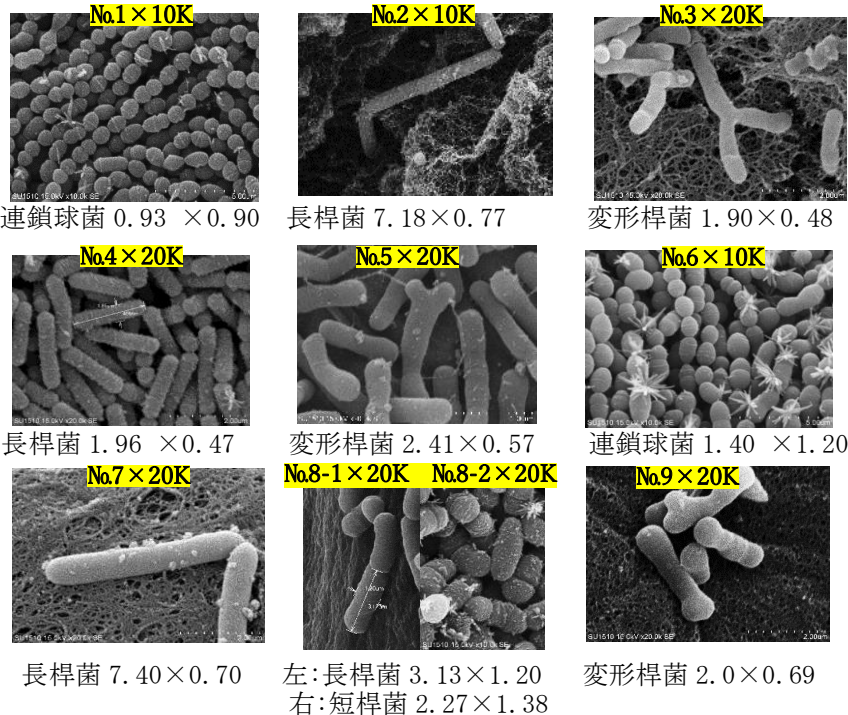


図 3 発酵乳生産菌(No.1~9)の SEM 細胞観察(長径×短径をμm で表記)

尚、No.8 の R1 発酵乳生産菌は 2 種類を分離した(図 4)。培養後、形成された大きいコロニーは長桿菌で No.8-1、小さいコロニーは短桿菌で No.8-2 と区別した。

微生物細胞の観察は生物顕微鏡と走査電子顕微鏡で行ったが、形状把握は一致した。細胞の大きさは、走査電子顕微鏡の画像計測機能を使用し、より詳細に測定することができた。

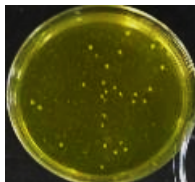
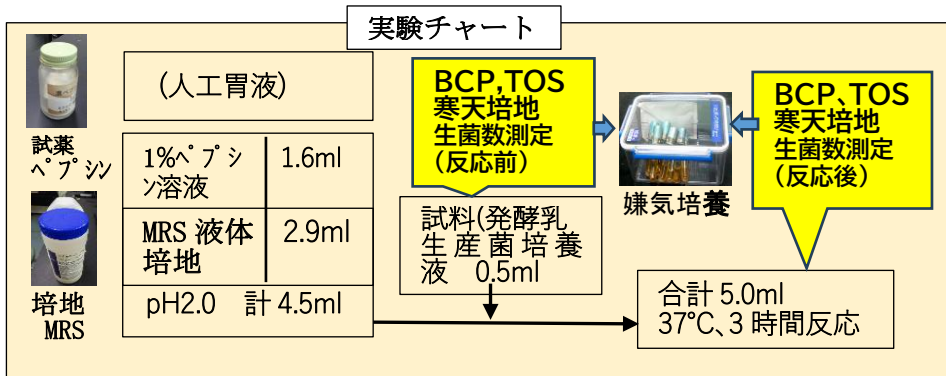


図 4 No.8 発酵乳生産菌の分離

4. 市販発酵乳生産菌の人工胃液耐性試験

発酵乳生産菌の胃液耐性は、ペプシン 1%を含む人工胃液(pH2.0)反応より、反応前後の菌数を比較することで判定できると考えた。実験方法は以下の実験チャートで進めた。尚、発酵乳生産菌はあらかじめ 3℃、5 日間 MRS 液体培地で嫌気培養したものを使用した。



生菌数検査は検体(反応前後の培養液-図 5)を滅菌生理食塩水で 10⁶~10⁷ 倍に希釈して専用培地に塗抹した。嫌気培養後、形成されたコロニー数から生菌数(CFU/ml)を計測した。

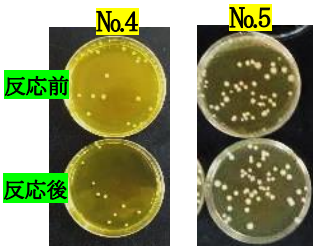


図 6 人工胃液耐性試験(例) 反応前後のコロニー数比較(10⁷倍希釈液)

図 5 人工胃液反応後の発酵乳生産菌培養液

結果：培養後観察(図 6)から反応前後のコロニー数をカウントし、生菌数、耐性率を纏めた(表 2、図 7)。

尚、発酵乳生産菌の人工胃液耐性率は以下の式で計算した。

$$\text{耐性率}(\%) = \frac{\text{反応後の生菌数}}{\text{反応前の生菌数}} \times 100$$

表 2 市販発酵乳の人工胃液耐性試験(生菌数 CFU/ml)

菌No.	1	2	3	4	5	6	7	8-1	8-2	9
反応前 生菌数	6.5 ×10 ⁸	5.3 ×10 ⁸		1.4 ×10 ⁸	4.8 ×10 ⁸	2.5 ×10 ⁸	6.7 ×10 ⁷	1.5 ×10 ⁸	1.38 ×10 ⁹	1.04 ×10 ⁹
反応後 生菌数	2.0 ×10 ⁸	1.9 ×10 ⁸		1.1 ×10 ⁸	4.7 ×10 ⁸	1.3 ×10 ⁸	4.8 ×10 ⁷	1.2 ×10 ⁸		1.8 ×10 ⁸
耐性率 %	30.1	35.8		78.6	97.9	52.0	71.6	80.0	<0.07	17.3

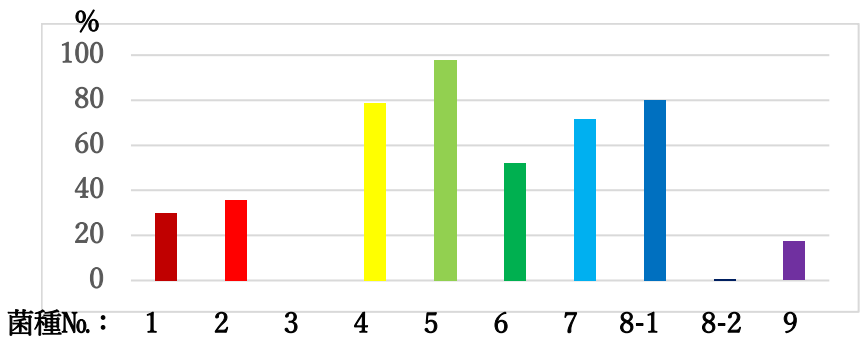


図 7 市販発酵乳の人工胃液耐性率(%)

考察：10 種の発酵乳生産菌の内、No.3 は生菌数検査の 10⁶ 倍希釈液でコロニー非検出のため耐性率を求めることができなかった。MRS 液体培地の生育適性が課題となる。人工胃液に耐性を有した菌、例えば 50%以上の耐性率を示したNo.4、5、6、7、8-1 は腸までたどり着く可能性が高いと考えられる。特に、耐性率の高いNo.5 のメーカーは“100 倍 胃酸に強い 腸まで届く〇〇菌”と謳っている。

今後に向けて：腸に届いたプロバイオティクス(乳酸菌やビフィズス菌)が糖を分解して乳酸を作り、腸内を酸性にして、腸内善玉菌(ビフィズス菌)の働きを活発化し、健康効果(便通、免疫力向上、老化防止など)に繋がる可能性を秘めている。但し、腸で定着するには検証が必要で、腸液に晒して調べる必要がある。又、日常的に食する果物や野菜などに付着している乳酸菌についてもプロバイオティクスの可能性を調べたい。