

6 乳酸菌は本当に腸に届くのか ～乳酸菌は酸に強い？～

1 研究の動機

私の父はヤクルト(株)に勤務しており、子供のころから乳酸菌飲料をよく飲んでいました。高校に入り、乳酸菌の培養ができることを知り、乳酸菌飲料に表示されていることについて確かめてみたいと考えた。

2 研究の目的

乳酸菌飲料の表示について「乳酸菌〇〇億」という菌数と、「生きて腸まで届く」という表現について確かめる。

3 実験Ⅰ 純水で希釈した試料を培養し、コロニーの数から菌数を推定する。

(1) 試料

「ヤクルト」65ml 表示は「乳酸菌150億」

(2) 培地

ア MRS-Agar 培地 メルク社製

イ 乳酸菌検出用 MBCP 寒天培地
デンカ生研製

※乳酸菌の酸により培地の色が青から黄色に変わる。

ウ 一般細菌検出用 DDチェッカー
デンカ生研製

(3) 実験の手順

ア 培地づくり (MRS 培地)

- ① メスフラスコとコニカルビーカーとシャーレを乾熱滅菌機器180℃で滅菌する。
- ② メスフラスコで純水200mlを計り、それをコニカルビーカーに移す。
- ③ 培地13.24gを天秤で計る。
- ④ ⑤で計った培地を②のコニカルビーカーに入れ、ガラス棒を使い、湯煎でよく溶かす。
- ⑤ ④の溶かした培地に炭酸カルシウムを葉さじ6分の1ぐらい加えかき混ぜる。
- ⑥ ⑤にアルミ箔をかぶせ、オートクレーブを使って、115℃で15分間滅菌する。

⑦ 滅菌した培地をシャーレに3分の1程注ぐ。

⑧ しばらく置いて固まらせる。

イ 希釈液をつくる

- ① 滅菌水(115℃で15分間)を200ml用意する。
- ② メスフラスコとマイクロピペット用チップを滅菌する。
- ③ 2個のメスフラスコにあらかじめ滅菌水を100mlずつ入れておく。
- ④ 乳酸菌飲料を50 μ lのマイクロピペットで2回(0.1ml)メスフラスコに入れる(10³希釈)。
- ⑤ ④をよく混ぜ、それを④と同じ方法で0.1mlとり、もう1つのメスフラスコに入れる(10⁶希釈)。

ウ 植え付け

- ① マイクロピペット用チップを滅菌する。
- ② 無菌箱の中をアルコールで殺菌する。
- ③ 無菌箱の中でMRS 培地のシャーレに希釈液を0.1ml 垂らし、シャーレを回して広げる。
- ④ ③を3枚作る。
- ⑤ 一般細菌用培地と乳酸菌検出用培地には50 μ l ずつ垂らし、③と同じように3枚ずつ作る。

エ 培養

- ① 37℃で2日間培養する。

(4) 結果

試料0.1ml を滅菌水に加え全体を100mlにすると、1000倍に希釈することになる。この操作を2回繰り返したので100万倍=10⁶倍希釈となる。0.1ml を植え付け・培養した場合はさらに10倍希釈したことになるので1ml あたりの菌数は、コロニー数 $\times 10^7$ 倍、50 μ l を植え付け・培養した場合はコロニー数 $\times 2 \times 10^7$ 倍で1ml あたりの菌数が計算できる(表1)。

	培地上のコロニーの数			平均	1 ml あたりの菌数	
	15個	12個	24個		1.7×10 ⁸	1億7千万
MRS 培地	15個	12個	24個	17個	1.7×10 ⁸	1億7千万
一般細菌用培地	12個	14個	5個	10個	2.0×10 ⁸	2億3百万
乳酸菌検出用培地	2個	11個	11個	8個	1.6×10 ⁸	1億6千万

表1 培地上のコロニーの数と1 ml あたりの菌数

(5) 考察

試料は一本65ml 入りでMRS 培地ではコロニー数が平均17個だったので $17 \times 10^7 \times 65 = 1.105 \times 10^{10}$ (110億5千万)、乳酸菌検出用培地では平均8個だったので $8 \times 2 \times 10^7 \times 65 = 1.04 \times 10^{10}$ (104億)と計算できた。

表示には65ml 入りの容器に150億と書いてあったので、実験の精度を考えると、表示どおりの菌が入っていると考えられる。

一般細菌用培地では乳酸菌用培地より数が多いが、誤差の範囲なのか乳酸菌以外の菌の混入かははっきりしない。培養のシャーレを増やして確認したい。

4 実験II 塩酸でpH2にした純水に試料を入れ、そのまま培養し、菌数を数える。

(1) 試料 「ヤクルト」65ml 入り

(2) 培地

- ア MRS-Agar 培地 メルク社製
- イ 乳酸菌検出用 MBCP 寒天培地
デンカ生研製

(3) 実験の手順

ア 培地づくり

実験1と同様の手順でMRS 培地を作る。

イ 試料をpH2.0にした純水で希釈する。

- ① 滅菌水(118°Cで15分間)を300ml 用意する。
- ② メスフラスコ(4つ)とマイクロピペット用チップ(6つ)を滅菌する。
- ③ 滅菌水に塩酸を加えpH2.0にする。
- ④ メスフラスコに③を100ml ずつ入れ、アルミ箔をかぶせ滅菌する。
- ⑤ ④に試料を50 μ lのマイクロピペットで2回(0.1ml)入れる。

ウ 植え付け

- ① マイクロピペット用チップを滅菌する。
- ② 無菌箱の中をアルコールで殺菌する。

③ 無菌箱の中でMRS 培地を入れたシャーレに希釈液を0.1ml 垂らし、シャーレを回して広げる。

④ 乳酸菌検出用培地には50 μ l 垂らす。

エ 培養

① 37°Cで2日間培養する。

(4) 結果

ア 試料自体はpH3.4であった。

イ pH2.0の希釈液ごと培養しても、菌の増殖がはっきりと見られた(写真1、2)。

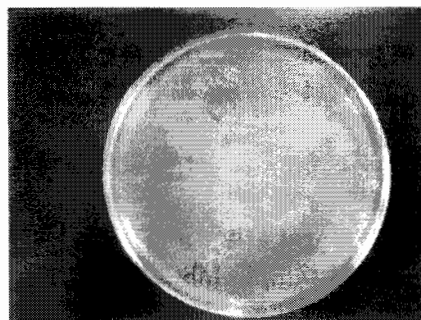


写真1 MRS 培地

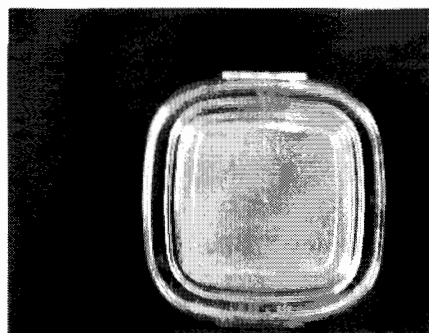


写真2 乳酸菌検出用培地

(6) 考察

試料中の乳酸菌は、pH2.0の中に入れてもすぐには死なないこと、pH2.0の希釈液のまま培養してもコロニーが形成されることがわかった。

5 実験Ⅲ 塩酸でpH2.0にした純水に試料を入れ、一定時間置いた後培養し、菌数を数える。

(1) 試料 「ヤクルト」65ml 入り

(2) 培地

- ア MRS-Agar 培地 メルク社製
- イ 乳酸菌検出用 MBCP 寒天培地
デンカ生研製

(3) 実験の手順

ア 培地づくり

①実験Ⅰと同様の手順でMRS 培地を作る。

イ pH2.0にした純水中に一定時間おく。

① 実験Ⅱと同様の手順でpH2.0にした純水を100ml ずつメスフラスコに入れ、アルミ箔をかぶせ滅菌する。

② 植え付け時間の8時間前、4時間前、2時間前に、①で用意したメスフラスコに試料を50 μ l のピペットで2回(0.1ml) 入れ、室温に置く。

ウ 植え付け

① アルコールで殺菌した無菌箱の中で8時間、4時間、2時間置いた希釈液を同時に植え付けする。

② 無菌箱の中でMRS 培地を入れたシャーレに希釈液を0.1ml 垂らし、シャーレを回して広げる。

③ 乳酸菌検出用培地には50 μ l 垂らし、シャーレを回して広げる。

エ 培養

① 37 $^{\circ}$ Cで2日間培養する。

(4) 結果

ア 各培地におけるコロニーの数

	8時間	4時間	2時間
MRS 培地	382	多数	多数
乳酸菌検出用培地	多数	多数	多数

表2 各培地におけるコロニーの数

イ 各培地におけるコロニーの数の比較

MRS 培地 2時間>4時間>8時間

乳酸菌検出用培地 2時間>4時間>8時間

ウ 各培地におけるコロニーの様子

① 2時間後(写真3)

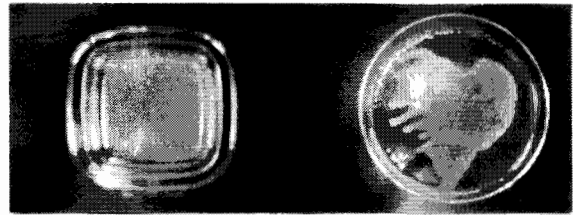


写真3 乳酸菌検出用培地 MRS 培地

どちらの培地にも全体に細かいコロニーができています。

② 4時間後(写真4)

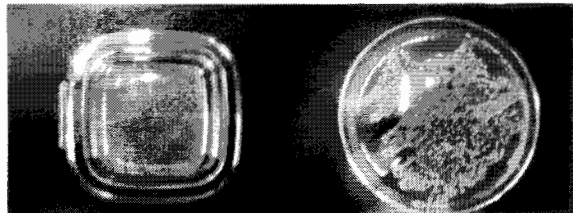


写真4 乳酸菌検出用培地 MRS 培地

全体に細かいコロニーができていますが、2時間のものよりは一つ一つが大きく、数も少ない。

③ 8時間後(写真5)

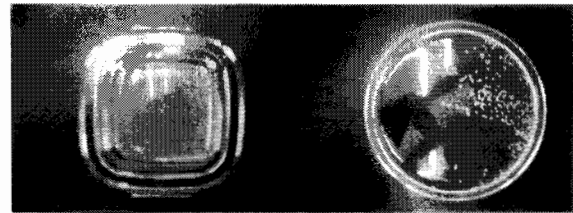


写真5 乳酸菌検出用培地 MRS 培地

コロニー数の減少がはっきり見え、一つ一つが大きく、計数も可能であった。

(5) 考察

pH2.0にした純水中に8時間置いても、生き残っている菌があった。しかし、2時間、4時間、8時間と強酸性の中に長く入れておくと徐々に菌数が減っていくことから、乳酸菌はpH2.0では生き続けることはできないことがわかった。

MRS 培地では 8 時間後で 328 個のコロニーが観察された。実験 I と同様の計算をすると 1ml あたり 330 万、65ml あたり 2.15 億の菌がいたと推定できる。これは表示の 150 億と比べると約 70 分の 1 であり、かなりの割合で生き残ることがわかる。

胃の中は pH2 で食べたものは普通 2 時間ほどで腸に送られるという。実際の胃では胃酸以外の影響も考えなければならないが、試料中の乳酸菌は胃を通過することができるのではないだろうか。

6 実験Ⅳ 4 種類の試料を塩酸で pH2.0 にした純水に入れ、8 時間後に培養し、菌数を数える。純水で希釈した直後の試料も培養する。

(1) 試料

試料 1 「ソフール」ヨーグルト ヤクルト製

試料 2 「明治プロビオヨーグルト・LG21」

飲むヨーグルトタイプ 明治製

試料 3 「美しいあした」飲むヨーグルトタイプ

試料 4 「ブルガリア飲むヨーグルト・LB81」

(2) 培地

ア MRS-Agar 培地 メルク社製

イ 乳酸菌検出用 MBCP 寒天培地
デンカ生研製

(3) 実験の手順

ア 培地づくり

① 実験 I と同様の手順で MRS 培地を作る。

イ pH2.0 にした純水中に 8 時間おく。

① 実験 II と同様の手順で pH2.0 にした純水を 100ml ずつメスフラスコに入れ、アルミ箔をかぶせ滅菌する。

② 植え付け時間の 8 時間前に、① で用意したメスフラスコに試料 1～4 をそれぞれ 50 μ l のピペットで 2 回 (0.1ml) 入れ、室温に置く。

ウ 植え付け

① アルコールで殺菌した無菌箱の中で 8 時間置いた希釈液を同時に植え付けする。

② 無菌箱の中で MRS 培地を入れたシャーレに希釈液を 0.1ml 垂らし、

シャーレを回して広げる。

③ 酸菌検出用培地には 50 μ l 垂らし、シャーレを回して広げる。

④ 対象として純水で希釈したものも、同様に植え付けをする。

エ 培養

① 37°C で 2 日間培養する。

(4) 結果

ア コロニー数

		試料 1	試料 2	試料 3	試料 4
純水	乳酸菌検出用培地	5 3 4	多数	多数	多数
pH2	MRS 培地	2 0 3	3 7 4	コロニー無し	コロニー無し
	乳酸菌検出用培地	多数	多数	コロニー無し	コロニー無し

表 3 培地上のコロニーの数

イ コロニーの様子(写真 6)

上段に純水で希釈し、すぐに植付けをしたもの、下段に pH2.0 で 8 時間置いたものを並べた。すぐに植付けしたものは試料 1～4 のすべての培地でコロニーが確認され、培地の色が黄色に変わった。8 時間置いたものでは試料 1、2 ではコロニーが確認され、培地の色が黄色に変わったが、試料 3、4 ではコロニーが確認されず、培地の色も青色のままだった。

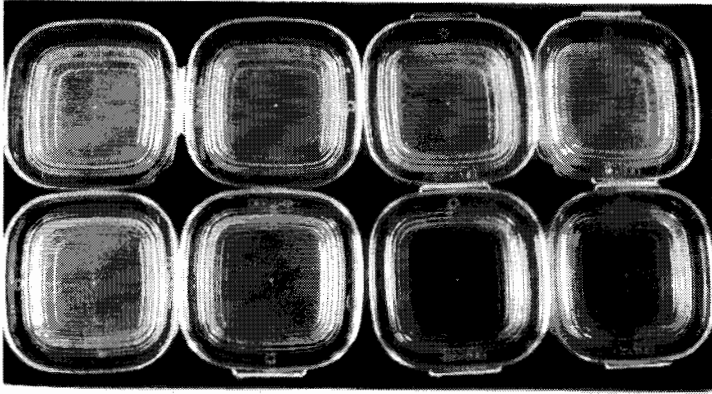
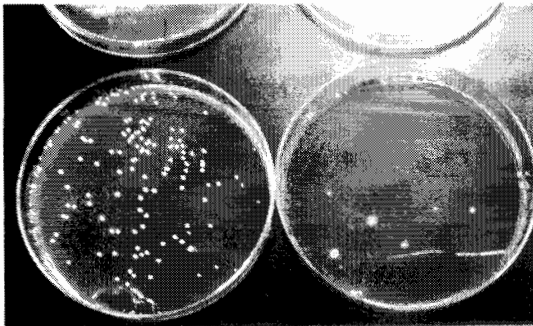


写真6 乳酸菌検出用培地のコロニーの様子

ウ MRS 培地のコロニーの様子(写真7)

MRS 培地でもpH2.0で希釈し8時間置いたものは、試料1、2のみコロニーが観察された。試料1のコロニーは直径約2mm、きれいな円形で大きさも揃っている。

試料2は直径2～4mmの大きなコロニーが9個、その他は小さく平らで形も崩れている。



試料1

試料2

写真7 MRS 培地のコロニーの様子

(5) 考察

「純水、0時間」で培養した試料1～4はすべて菌が確認され、生きた乳酸菌が入っていることが確かめられた。しかし、「pH2.0、8時間」で培養した結果、試料1、2では菌は生き残っており、試料3、4では菌は死滅していた。

今回の結果からは、製品によって乳酸菌の強酸性への耐性に差があることがわかった。また、試料1、2は両方とも「pH2.0、8時間」でも菌が生き残っていたが、コロニーの形か

ら試料1の菌の方がよい状態だと考えられる。試料3、4も2時間や4時間後に培養すれば、菌が生き残っていた可能性もあるので、時間経過を細かくして実験したい。

7 まとめ

乳酸菌が本当にpH2.0の強酸性状態に置いても、8時間も生き残ることに正直驚いた。乳酸菌の菌数の計測や、pH2.0の強酸性状態に置いた試料を培養した結果から、「150億」の乳酸菌が、「生きたまま腸まで届く」という乳酸菌飲料の表示は正しいことが確認された。

8 参考文献

「探求的な活動を促す観察・実験」 静岡県総合教育センター理科研修部編