

1 研究の動機

私の父はヤクルト（株）に勤めており、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、乳酸菌飲料の表示について確かめてみたいと考えた。

2 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 昨年の研究

乳酸菌飲料中の菌数を推定し、強酸性に対する耐性を調べた。

まず、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したところ、1mlあたり1億7千万となり、表示どおりの菌が入っていることがわかった。

次に、塩酸でpH2.0に調整した純水に試料を入れ、0時間、2時間、4時間、8時間後に培養し、菌数を数えた。結果はどの培地でも菌の増殖がはっきりと見られ、試料中の乳酸菌は、強酸性の中に8時間入れても生き残ることがわかった。8時間後のコロニー数は0時間の約70分の1であり、コロニーの数は時間の経過とともに徐々に減っていくことから、乳酸菌はpH2.0の環境では生き続けることはできないと考えた。

4 今年の研究の概要

昨年は胃液を想定してpH2.0の影響を調べたが、今年はそれに加えてすい液を想定したpH8.0の影響と酵素の影響を調べた。試料は昨年のヤクルト、ブルガリアに加えて、植物性乳酸菌といわれるラブレについても実験した。

5 植物性乳酸菌について

ヨーグルトなどの乳酸菌は動物性の牛乳の中で増殖するのにに対し、ラブレに含まれる乳酸菌は京

都の「すぐき」という漬物から分離されたものである。つまり、植物の中で増殖するため植物性として区別されている。

6 培地について

乳酸菌は栄養要求が複雑なので市販の完全培地を利用した。昨年のMRS寒天培地に炭酸カルシウムを添加したものを使用した。炭酸カルシウムを添加すると培地は懸濁するが、乳酸菌の酸により培地が透明になるので(図1)、その変化により、コロニーが乳酸菌であることがわかる。

(1)培地の作成

ア MRS - Agar 培地 (メルク社製) を 13.24 g 計り、200 ml の純水に湯煎でよく溶かし、炭酸カルシウムを添加する。

イ オートクレーブで、118℃で15分間滅菌する。

ウ 滅菌した培地をシャーレに3分の1程注ぎ、冷やし固める。

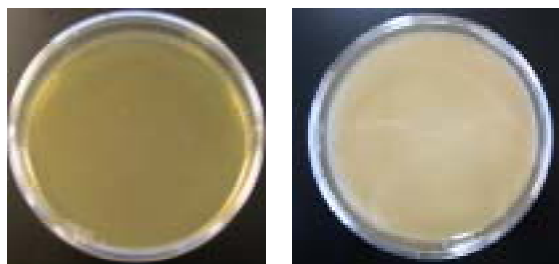


図1 左：炭酸カルシウム未添加（透明）
右：炭酸カルシウム添加（懸濁）

7 実験1 胃液とすい液を想定したpHの影響 (1)方法

塩酸でpH2.0にした純水、水酸化ナトリウムでpH8.0にした純水のそれぞれ100mlに試料0.1mlを入れ、10³倍に希釈する。37℃で3時間置いた後、培地に0.1mlずつ植付けを行う。植付け後3日間培養し、菌数を数えた。また、比較として純水で希釈した場合も行った。

(2)結果

培養後のコロニーの直径と数（状態）を表1に示す。

ヤクルトは昨年同様pH 2.0、pH 7.0では、形、大きさともに揃ったコロニーを約700個形成した。pH 8.0でも約800個のコロニーを形成し、アルカリ性の影響も受けないことが分かったが、コロニーの形が不揃いで小さいものが多かった。図2はヤクルトのpH 2.0、pH 7.0、pH 8.0の培養後のコロニーの様子である。pH 2.0ではコロニーのない両側は炭酸カルシウムが残りにごっているが、コロニーのある中心部は乳酸菌の酸により炭酸カルシウムが溶解培地が透明になっている。

ラブレはMRS培地ではpH 2.0ではコロニーが見られなかった。pH 7.0、pH 8.0でも大きさの揃ったコロニーが見られず、数も少ないことが確認された。

ブルガリアはpH 7.0、pH 8.0では形の揃った小さいコロニーを多数形成したが、pH 2.0ではラブレ同様コロニーは見られなかった。

(3)考察

昨年のヤクルトの菌数の推定では1mlあたり1億7千万であり、8時間後に70分の1になって

いた。昨年の結果と比較して、700個のコロニー数は推定した菌数の約25分の1であり、ヤクルトに含まれる乳酸菌は強酸性、アルカリ性の両方に対する耐性が強いと考えられる。

また、ブルガリアに含まれる乳酸菌は強酸性に比べてアルカリ性に対する耐性が強いと考えられ、ラブレの乳酸菌は今回の実験では強酸性、アルカリ性の両方に対する耐性が低いことがわかった。

8 実験2 消化酵素による影響

(1)方法

pH 7.0の純水、塩酸でpH 2.0にした純水、水酸化ナトリウムでpH 8.0にした純水のそれぞれ100mlに消化酵素0.1gと試料（ヤクルト）0.1mlを入れ、37℃で3時間置いた後、マイクロピペットを用い0.1mlずつ植付けを行う。植付け後3日間培養し、菌数を数えた。

(2)培地の調整

MRS - Agar 培地 メルク社製（炭酸カルシウム添加）に酵素として、ジアスターゼ0.1g、またはキャベジン（ジオジアスターゼ・リパーゼAP12）2錠を添加

表1 培地上のコロニーの直径と数（状態）

	pH 2.0	pH 7.0	pH 8.0
ヤクルト	0.5～1.0mm 約700個（揃）	0.5～1.0mm 約700個（揃）	0.2～1.0mm 約800個（不揃）
ラブレ	コロニーなし	0.5～2.0mm 52個（不揃）	0.5～1.0mm 4個（不揃）
ブルガリア	コロニーなし	0.1～0.3mm 測定不可（揃）	0.1～0.2mm 測定不可（揃）



pH2.0

pH7.0

pH8.0

図2 培地の様子

(3) 結果

培養後のコロニーの直径と数（状態）を表2に、コロニーの様子を図3に示す。

糖を分解するジアスターゼを加えた場合、pH2.0とpH8.0の培地では大きさのそろったコロニーが見られた。

糖と脂肪を分解するリパーゼを含む「キャベジン」を加えた場合pH2.0～pH8.0のすべての培地で大きさのそろったコロニーが見られた。pH7.0の培地はコロニーの数が多く、測定不可とした。

(4) 考察

消化酵素を添加しない場合と比較して、どちらも乳酸菌の数の減少が見られることから乳酸菌は消化酵素の影響を受けることが確認された。しかし、数の著しい減少は見られなかったため消化酵素中でも十分生き残れると考えられる。このことから乳酸菌は胃酸・す

い液中の消化酵素に対しても耐性があると考えられる。

9 まとめ

実験1, 2から乳酸菌は私たちのからだから分泌される胃酸・すい液に含まれる消化酵素の中でも生き残ることが確認された。昨年の結果も踏まえると、「150億」の乳酸菌が、「生きたまま腸まで届く」という表示は正しいことが確認できた。

10 今後の課題

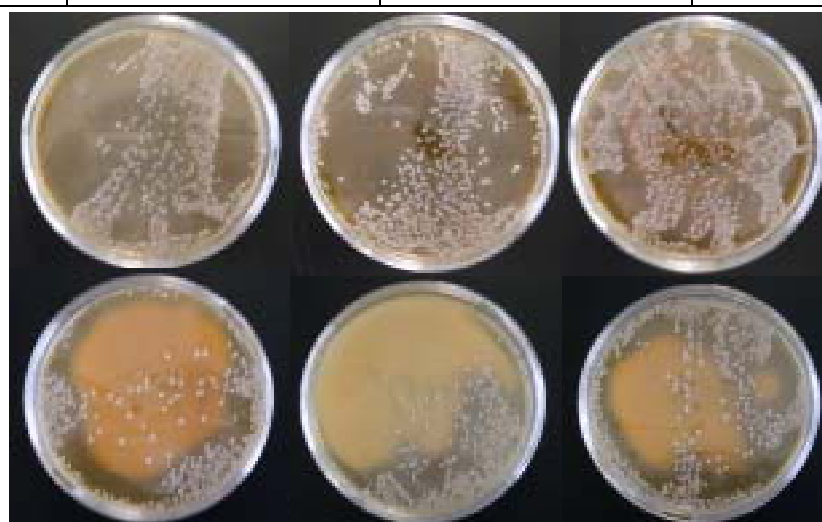
今回、胃液中のタンパク質分解酵素であるペプシンが入手できず実験できなかったため、今後は他の酵素に対する耐性も調べていきたい。

11 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

表2 培地上のコロニーの直径と数（状態）

	pH 2.0	pH 7.0	pH 8.0
酵素添加なし	0.5～1.0mm 約700個（揃）	0.5～1.0mm 約700個（揃）	0.2～1.0mm 約800個（不揃）
ジアスターゼ	0.5～1.0mm 約400個（揃）	0.5～1.5mm 約500個（不揃）	0.5～1.0mm 約700個（揃）
キャベジン リパーゼ・ジアスターゼ	0.5～1.5mm 353個（揃）	0.1～0.5mm 測定不可（揃）	0.5～1.0mm 477個（揃）



pH 2.0 pH 7.0 pH 8.0
上段：ジアスターゼ添加 下段：キャベジン添加

図3 培養後の培地の様子（ヤクルト）