

ぬか漬けからの乳酸菌 ～ 腸までとどけ ～

小島 香厘 井上 有彩 次田 萌笑

1. 要旨

漬物から得られる乳酸菌は、ほかのヨーグルトなどの乳酸菌よりも「腸で生きる力」が強いことが分かっている。また、漬物の乳酸菌が悪玉菌を寄せ付けない力を持っていることが発見されている（参考文献1）。私たちは11種類の野菜を用いてぬか漬けを作り、そこから乳酸菌を取り出して胃酸耐性を調べる実験を行った。その結果、キュウリ、コンニャク、カボチャのぬか漬けから乳酸菌株を得ることができ、その中でもカボチャのぬか漬けから得られた乳酸菌株が最も胃酸耐性が強いと考えられた。

2. 結論・目的

乳酸菌とは、発酵によって糖から乳酸を産生する細菌の総称で、現在は26属381種が知られており、基本的には嫌気的な条件で生育する。役割は、腸内の悪玉菌の繁殖を抑え、バランスを整えることである（参考文献4, 8）。乳酸菌などの細菌類やカビ類は培地上にコロニーと呼ばれる肉眼で見える集まりを形成する。コロニーの特性は、高さや表面の様子、大きさ及び発色など、形態にあらわれる。現在、漬物から得られる乳酸菌は、ほかのヨーグルトなどの乳酸菌よりも「腸で生きる力」が強いことが分かっている。また、漬物の乳酸菌が悪玉菌を寄せ付けない力を持っていることが発見されている（参考文献1）。そこで、私たちはぬか漬けから得られる乳酸菌について調べてみたいと思い、ぬか漬けを作り市販の商品に含まれる乳酸菌より胃酸や他の菌に強く、特徴のある乳酸菌を見つけ出すことと、取り出した乳酸菌の詳しい性質を調べ、それを応用することを目的として研究を始めた。

3. 材料と方法

【実験1】「乳酸菌株を得る」

使用した器具は全てオートクレーブ（120℃, 1時間）、乾熱滅菌機（200℃, 2時間）により滅菌した。

いりぬかに水と塩を入れて混ぜ、ぬか床を作った。約一週間後に11種類の野菜（キュウリ、コンニャク、カボチャ、パプリカ、リンゴ、レタス、サツマイモ、ニンジン、カキ、ニンニク、スイカの皮）をぬか床に漬け、ぬか漬けを作った。野菜はぬか漬けに向いている野菜（参考文献2, 3）とあまり知られていないが、ぬか漬けにするとおいしい変わり種を調べて選んだ。

次に、日水製薬の一般乳酸菌接種用培地（Code05800）：（組成 59.6 g（1 L分）中、酵母エキス 5.5 g, ペプトン 12.5 g, ブドウ糖 11.0 g, リン酸二水素カリウム 0.25 g, リン酸一水素カリウム 0.25 g, 酢酸ナトリウム 10.0 g, 硫酸マグネシウム 0.1 g, 硫酸マンガン 5.0 mg, 硫酸第一鉄 5.0 g, 寒天 20.0 g, pH 6.8±）と日水製薬の一般乳酸菌接種用培地（Code05801）：（組成 39.6 g（1 L分）寒天以外はCode05800と同様）を使用しシャーレの平板培地と高層培地、液体培地を作成した。培地には乳酸菌の有無を判断するために酸と反応し透明になる性質を持つ炭酸カルシウムを入れた（参考文献7）。

そして、ぬか漬けからシャーレの平板培地に白金耳を使って画線法で播種し、25℃で5日間培養した。画線法とは、火炎滅菌した白金耳で菌を採取し、白金耳を平板培地の表面上を軽く移動させて菌を画線状に塗布していく培養法であり、画線塗布を続けていくと、次第に接種される菌数は減っていくため、独立したコロニーを得ることができる。また、シャーレの平板培地にできた独立したコロニーを少し取り、植え継ぎ用に試験管の高層培地に植え付けた。6日後、シャーレの平板培地のコロニーと高層培地の増殖の仕方を観察をした。

【実験2】「得られた乳酸菌株を利用して胃酸耐性を調べる」

使用した器具は全てオートクレーブ（120℃, 1時間）、乾熱滅菌機（200℃, 2時間）により滅菌した。

シャーレの平板培地からコロニーを採取して液体培地（10 mL）に溶かし、培養して沈殿を作った（前培養）。人工胃液（9 mL, pH 2 または 3 に調節した塩酸+4%ペプシン溶液（参考文献5, 6, 9, 10））を作り人の体温（36.5℃）に温め、そこに培養してできた沈殿を1 mLずつ加えた。コントロールとして液体培地にも沈殿を加えた。アルコールにつけて火炎滅菌したスプレッダーを使い、シャーレの平板培地に播種した。人口胃液に沈殿を加えてから0, 30, 60分後ごとに行った。シャーレは胃と同様に酸素のない条件にするために酸素吸収剤と酸素の有無が分かるインジケーターを入れた容器で培養した。

数日後、シャーレの平板培地のコロニーの様子を観察した。

【実験3】「得られた乳酸菌株を利用して胃酸耐性を調べる」

使用した器具は全てオートクレーブ（120℃，1時間），乾熱滅菌機（200℃，2時間）により滅菌した。植え継ぎ用の試験管の高層培地から乳酸菌株を採取して液体培地（10 mL）でできた沈殿をスプレッダーでシャーレの平）に溶かし，培養して沈殿を作った（前培養）。板培地に播種し，その後すぐに，人の体温（36.5℃）に温めておいた人工胃液（9 mL，pH 2 または 3 に調節した塩酸＋それぞれペプシンありとなし）を染み込ませた直径 6 mm ろ紙を置いた（図1）。その後の観察でろ紙から離れたところでの生育が確認できれば，胃酸に耐えられなかったと判断した。また，ろ紙の周辺でも生育が確認できれば胃酸に耐えられたと判断した。野菜の種類ごとにシャーレを 3 枚ずつ作った。シャーレは胃と同様に酸素のない条件にするために酸素吸収剤と酸素の有無が分かるインジケーターを入れた容器で培養した。12 日後，ろ紙周辺のコロニーの様子を観察した。

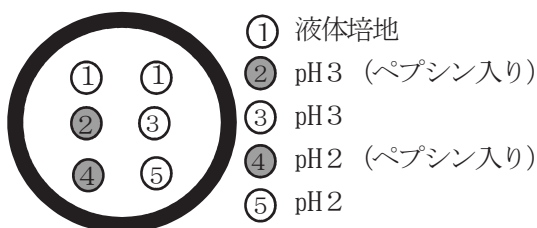


図1 ろ紙の配置

【実験4】「得られた乳酸菌株を利用して胃酸耐性を調べる」

使用した器具は全てオートクレーブ（120℃，1時間），乾熱滅菌機（200℃，2時間）により滅菌した。植え継ぎ用の試験管の高層培地から乳酸菌株を採取して液体培地（10 mL）に溶かし，培養して沈殿を作った（前培養）。できた沈殿をスプレッダーでシャーレの平板培地に播種した。実験3と違って，同時ではなく，数日後コロニーが形成されることを確認してから人の体温（36.5℃）に温めておいた人工胃液（9 mL，pH 2 または 3 に調節した塩酸＋それぞれペプシンありとなし）を染み込ませたろ紙を置いた。野菜の種類ごとにシャーレを 3 枚ずつ作った。シャーレは胃と同様に酸素のない条件にするために酸素吸収剤と酸素の有無が分かるインジケーターを入れた容器で培養した。7 日後，ろ紙周辺のコロニーを観察した。また，ろ紙の下の変化も調べるために，ろ紙をはがして観察した。

4. 結果

【実験1】

平板培地で乳酸菌と見られる透明のコロニーが見られたのはキュウリとコンニャクとカボチャであった。コロニーのまわりが透明になっているものが乳酸菌のコロニーである（図2）。この3株は高層培地でも下の方で増殖し，乳酸菌の特徴である嫌気性と一致していることから乳酸菌と考えられた。その他のパプリカ，リンゴ，レタス，サツマイモ，ニンジン，カキ，ニンニク，スイカの皮のシャーレには乳酸菌は生育していなかった。

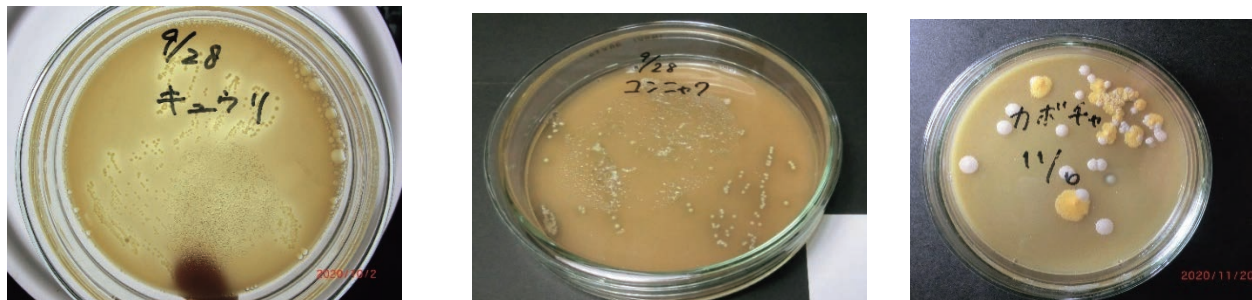


図2 乳酸菌のコロニーが見られたシャーレ

【実験2】

時間ごとの変化は見られず、全ての条件で同じ様に増殖した。

【実験3】

この方法ではコロニーが見られず、pHによる違いが見られなかった。そこで、シャーレに播種することと人工胃液に浸したろ紙を置くことを同時に行わず、次の実験では乳酸菌のコロニーがシャーレに形成された事を確認してから、ろ紙を置くことにした。

【実験4】

ろ紙をはがした様子を写真に撮り、写真を乳酸菌の有無が分かりやすいように画像処理して判別した(図3)。図3右のように完全にコロニーがなくなっていたら、人工胃液に耐えられなかったとして×、コロニーが残っていたら人工胃液に耐えられたとして○で表している(表1, 2, 3)。結果、以下のことが分かった。

キュウリ株は、人工胃液に耐えられたコロニーもあったが、pH2の人工胃液に耐えられなかったコロニーが多く見られた(表1)。

コンニャク株は、pH3の人工胃液に耐えられたコロニーも見られたが、ほとんどのコロニーが耐えられていなかった(表2)。

カボチャ株は、全体的に人工胃液に耐えられている傾向が見られた。3つのシャーレのうちの1つはカビによって、培地の状態が悪かったため観察ができなかった(表3)。

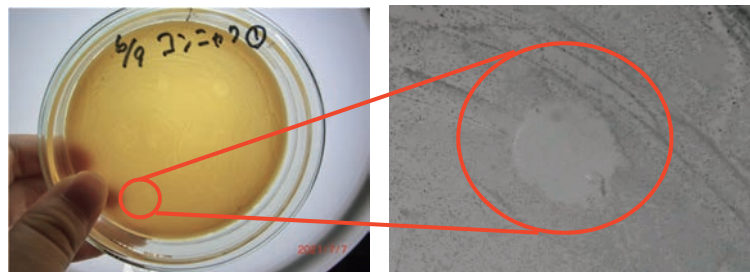


図3 左：ろ紙をはがした様子 右：画像処理した写真

	液体培地	pH3(ペプシン)	pH3	pH2(ペプシン)	pH2
①	×	○	×	×	×
②	×	×	○	○	×
③	×	○	×	×	×

◀ 表1 キュウリ株

	液体培地	pH3(ペプシン)	pH3	pH2(ペプシン)	pH2
①	×	×	○	×	×
②	×	×	○	×	×
③	×	×	×	×	×

◀ 表2 コンニャク株

	液体培地	pH3(ペプシン)	pH3	pH2(ペプシン)	pH2
①	×	○	○	○	○
②					
③	×	○	○	×	○

◀ 表3 カボチャ株

5. 考察

実験1より、ぬか漬けにする野菜や果物によって生育する乳酸菌の量は異なると考えられる。また、ぬか漬けに使用した11種類の野菜のうち、乳酸菌が見られたのはキュウリ、コンニャク、カボチャで、カボチャの乳酸菌のコロニーの大きさが一番大きかった事から、カボチャのぬか漬けから分離した乳酸菌が最も胃酸耐性が強いのではないかと考えた。

実験2では、コロニー1つ1つが小さすぎて、コロニーカウントができなかったため、コロニーの数で

調べることは不可能だと判断し、コロニーの生育する範囲で調べてみたら良いのではないかと考えた。

実験3より、どのシャーレにも乳酸菌のコロニーがほとんど見られず、観察が困難であったため、乳酸菌がシャーレに生育する前に人工胃液を浸したろ紙を置くと、乳酸菌のコロニーが生育する前に人工胃液に耐えられず、乳酸菌が十分に生育することができなかつたのではないかと考えた。そこで、乳酸菌を先に生育させてから、人工胃液に浸したろ紙を置くとよいのではないかと考えた。

実験4より、カボチャ株は人工胃液に耐えられた可能性が高いと考えられた。カボチャにはもともと栄養素が多く、さらにぬか漬けにすることでその栄養素が5~10倍に高められるため(参考文献11)、乳酸菌が生育しやすかつたのではないかと考えた。キュウリ株とコンニャク株は人工胃液に耐えられなかつた可能性が高いと考えられた。また、全ての乳酸菌株が液体培地に浸したろ紙を置いた場所に全く残ってなかつたことについては、原因の見当がつかなかつた。カボチャのぬか漬けから得た乳酸菌には胃酸耐性があると考えられるが、植え継ぎの期間の間隔など色々な条件を改善して、もう一度実験を行い液体培地による変化の原因についても解明したい。

6. 結論

ぬか漬けにする野菜や果物の種類によって、生育する乳酸菌の量は異なり、カボチャ、キュウリ、コンニャクの順に大きなコロニーが形成されることが分かつた。また実験4の結果から、ぬか漬けから取り出した乳酸菌には胃酸耐性があると言えるのではないかと考えられる。しかし、条件が不十分な点があるため、より正確性を高めるために、追実験を行う上で以下の4つの改善点が挙げられる。1つ目は、ろ紙を大きいものに変えることで結果を分かりやすくすることである。2つ目は、植え継ぎを1か月ごとに行うことで、乳酸菌の生命力を保つことである。3つ目は、実験中36.5℃に温めておくだけでなく、培養器内の温度も同様に保つようにすることである。4つ目は、ろ紙を置く前のシャーレの平板培地のpHを測り、それを考慮した上で実験を行うことである。

7. 参考文献

- 1) 「NHK—ぬか漬けの乳酸菌はなぜ強い？」
- 2) 「乳酸菌が多い食品」
- 3) 「乳酸菌マニアが選ぶ、乳酸菌が多い食品ランキング！」
- 4) 辨野吉見「プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能」モダンメディア57巻10号2011
- 5) 山本真弓, 山田満「乳酸菌の耐酸性について」
- 6) 和洋女子大学紀要 第37集
- 7) 平岡吏佳子, 宇田勲, 仲野翔太, 霜村典宏, 曾見忠則「植物由来胃酸耐性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* FSCM2-12 の胃酸耐性と莢膜形成との関連性」
- 8) 京都市産業技術所「乳酸菌ライブラリーの構築に関する研究」
- 9) 雪印乳業(株) 技術研究所「乳酸菌の人工消化液中での生残性」
- 10) 駒野小百合, 角谷智子, 小林恭一, 谷政八「胃酸・胆汁酸耐性を有し米発酵に適した植物性乳酸菌の選抜とその特性」
- 11) ぬか漬けの栄養が優秀! 美容と健康への効果! 生野菜より栄養素が多い?