

市販のヨーグルト中の乳酸菌の簡易同定と ヨーグルト化試験

生命化学学会

寺谷優輝

中村空大

畑山日陽里

1 実験の背景と経緯

近年では、発酵食品に含まれる微生物の働きが体に良い影響を与えると注目されている。そこで、発酵食品であるヨーグルトに着目した。我々の研究では、ヨーグルトや乳酸菌飲料を牛乳に添加して加温することで、牛乳が凝固し、ヨーグルトが形成されたことを確認した。このことから、ヨーグルトの凝固には、一般的に乳酸菌の共生関係が関与していると広く考えられるが、乳酸菌桿菌の単独でも凝固反応が起こる可能性があると考えられた。以上のことから、ヨーグルトや乳酸菌飲料にはどのような種類の乳酸菌が存在しているのか、また、ヨーグルト生成における複数の乳酸菌による共生系および単菌の乳酸菌の影響について興味をもち、本研究を実施した。

2 目的

本実験の目的は、市販のヨーグルトや乳酸菌飲料から MRS および M17 選択培地を用いて乳酸菌を分離培養する。分離された乳酸菌は、簡易同定キットである API キットを用いて簡易同定を行う。さらに、ヨーグルト作製には乳酸桿菌と乳酸球菌の共存関係が必要なのか、または単菌のみでも生成されるのかを確認する。

3 ヨーグルト化試験

3.1 実験試薬

1. 牛乳(明治 おいしい牛乳) 120 mL
2. 桿菌(Yakult Y1000) 4 mL
3. 桿菌と球菌(明治 ブルガリアヨーグルト) 4 g

3.2 実験器具

1. 滅菌済み 50 mL プラスチックチューブ 3 本
2. マイクロピペット
3. インキュベーター
4. pH メーター
5. 滅菌済み薬さじ
6. 台秤

3.3 実験手順

1. 50 mL プラスチックチューブを 3 本用意し、1 本目に Yakult1000、2 本目にヨーグルト、3 本目に菌なしと記入した。
2. 1. で定めた 1 本目の試料にメモリを参考に Yakult Y1000 を 3 mL 直接入れた。

3. 2 本目の試料に明治 ブルガリアヨーグルトを台秤で 3 g 計り入れた。
4. 3 本目の試料にメモリを参考に純水を 3 mL 計り入れた。
5. 2. 3. 4. で用意した 50mL プラスチックチューブの 40 mL のメモリまで牛乳を直接加えた。
6. 5. で用意した 3 本のプラスチックチューブを 42 °C で一晩インキュベートした。
7. 各チューブ内の試料の凝固具合を確認した。
8. pH メーターを用いて各試料の pH を測定した。

3.4 実験結果

チューブに各試料 (Yakult1000、ヨーグルト、純水) と牛乳を加えた時を培養前、それらをインキュベートした後を培養後として、それぞれの色、状態、pH を下記の表にまとめた。(Table1)

Table1 培養前後の pH の変化、凝固具合

	培養前	培養後
Yakult1000	pH:6.22 白色の液体状であった。	pH:4.74 やや黄色がかった白色のヨーグルト状と透明な液体に分離した。
ヨーグルト	pH:5.78 白色の液体状であった。	pH:3.67 白色のヨーグルト状であった。
菌なし	pH:6.72 白色の液体状であった。	pH:6.14 白色の液体状であった。

4 市販のヨーグルト中の乳酸菌の簡易同定とヨーグルト化試験

4.1 実験試薬

1. Yakult Y1000 1 g
2. 明治 ブルガリアヨーグルト 1 g
3. フジッコ カスピ海ヨーグルト 1 g
4. 明治 おいしい牛乳 450 mL
5. MRS 培地粉末 44 g
6. 寒天 12.8 g
7. M17 培地粉末 40 g
8. 塩化ナトリウム 0.85 g
9. アピ° 50CHL 培地
10. アピ° 50CH
11. アピマクファーランド標準液

12. ミネラルオイル

4.2 実験器具

1. オートクレーブ
2. pH メーター
3. 50 mL 遠沈管 3 本
4. 滅菌済み 1.5 mL チューブ 15 本
5. プラスチックシャーレ 72 枚
6. カルチャーチューブ 6 本
7. 10 mL 容 マクロピペット
8. 1000 μ L 容 マイクロピペット
9. 500 mL 三角フラスコ
10. メスシリンダー
11. 滅菌済みコンラージ棒
12. 滅菌済み白金耳エーゼ
13. 滅菌済み薬さじ 6 本
14. 台秤

4.3 実験手順

4.3.1 MRS 培地と M17 培地の作成

1. 500 mL の三角フラスコ 2 本に MRS 培地粉末 22 g ずつ、超純水 400 mL ずつを加えて攪拌した。その後、寒天をそれぞれ 6.4 g ずつ加えて攪拌した。
2. 500 mL の三角フラスコ 2 本に M17 培地粉末 20 g ずつ、超純水 400 mL ずつを加えて攪拌した。
3. 1. 2. の培地を電子レンジを用いて完全に溶解させた。
4. 各培地をオートクレーブ滅菌した (121°C、15 分)。
5. 寒天が固まらないうちにクリーンベンチ内で、9 cm プラスチックシャーレ 1 枚当たり 20 mL ずつ分注した。
6. 完全に寒天が固まるまで静置した (20 分程度)。
7. 作成した各平板培地は 30°C の培養室で 24 時間静置した。

4.3.2 ヨーグルト、乳酸菌飲料を生理食塩水による希釈

1. 三角フラスコに 0.85% 食塩水を調製し、作製し、オートクレーブにかけた。(121°C、15 分)
2. 滅菌済み 50 mL 遠沈管に市販のヨーグルト、乳酸菌飲料をそれぞれ 1 g 計り入れ、生理食塩水を 10 mL 容マクロピペットで 9 mL 加えて攪拌し、5 分間静置した。
3. 滅菌済みの生理食塩水を 1 mL 容 マイクロピペットを用いて滅菌済み 1.5 mL チューブ 15 本に 各 900 μ L 分注した。この時、チューブに作

製する各希釈系列 (10^{-1} 系～ 10^{-6} 系) と加える懸濁液の各試料名称を油性ペンで記入した。

4. 2. の懸濁液 (10^{-1} 系) 100 μL を 3. にて調製した各チューブ (10^{-2} 系と記入された) に加え、ピペッティングした。
5. 4. の各希釈液 (10^{-2} 系) 100 μL を 3. にて調製した各チューブ (10^{-3} 系と記入された) に加え、ピペッティングした。
6. 5. の作業を繰り返して 10^{-6} 系の希釈液まで作製した。

4.3.3 1.1 で作成した平板培地に 1.2 で調製した懸濁液を接種

1. クリーンベンチ内で 10^{-6} 系のから順に 10^{-1} 系まで希釈液 100 μL をマイクロピペットで MRS 寒天培地、M17 寒天培地に滴下・接種した。
2. 接種した懸濁液を滅菌済みコンラージ棒で塗布した。
3. 2. の平板培地を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 6 日間培養した。

4.3.4 培地中のコロニーから菌液を調製

1. 5 mL チューブに 2 mL の滅菌水を入れた。
2. 滅菌済み白金耳エーゼを用いて分離培地からコロニーを掻き取った。
3. 2. を 1. に懸濁後、ピペッティングし、菌液を調製した。
4. 滅菌済 5 mL カルチャーチューブに 5 mL の滅菌水を入れた。
5. 4. に 3. の菌液を滴下してマクファーランド スタндартと比較し、同じ濁度となるよう調製した (滴下数を記録した)。

4.3.5 API50CHL 培地を用いた培養

1. API50CHL 培地のアンプルを開け、各菌液を 4.3.4 の 5. で滴下した 2 倍量滴下しピペッティングした。
2. 1 mL マイクロピペットを用いて、各 5 種のプレートに調製した 1. の懸濁液を各カップに 0.5 mL 程度入れた。
3. カップ部分にミネラルオイルを重層し、嫌気状態にした。
4. 各 5 種 1 組のプレートは予め滅菌水を加えた 1 つのトレーで培養した。(37 $^{\circ}\text{C}$ 、48 時間)

4.3.6 API web による記録を入力

1. 色調の変化を見て、青のままであれば反応なし(-)、黄に変化していれば反応あり(+)として、+と-を API web に入力した。
2. その結果、各試薬に対する反応性の観点から各菌株の簡易同定を実施した。

4.3.7 牛乳に各菌液を接種し培養

1. クリーンベンチ内にて 4.3.4 で調製した各菌液を牛乳パック内の牛乳に接種した。
2. これら牛乳パックをインキュベーターで 37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間培養した。

3. ヨーグルト化の有無を新しいシャーレに乳酸菌を接種した牛乳をそれぞれ移して観察した。
4. また、これらの培養牛乳を pH メーターを用いて pH を測定した。

4.4 実験結果

乳酸菌全般に対する選択性を持つ MRS 培地と、乳酸菌球菌および一部の乳酸菌桿菌に対する選択性を持つ M17 培地を作製した。作製したそれぞれの培地にブルガリアヨーグルト、カスピ海ヨーグルト、Yakult1000 の希釈液を接種し、各希釈液に含まれる菌を培養した。各培地の持つ選択性から、MRS 培地には各試料に含まれるすべての乳酸菌が培養でき、M17 培地には乳酸菌球菌のみが培養できると考えた。培養の成功はコロニーが形成される有無で確認した。以下の Figure1-12 にはブルガリアヨーグルトの培養結果を示す培地の様子を示し、これらのデータを Table2 にまとめた。同様に、Figure13-24 にはカスピ海ヨーグルトの培養結果を示す培地の様子を示し、これらのデータを Table3 にまとめ、Figure25-36 には Yakult1000 の培養結果を示す培地の様子を示し、これらのデータを Table4 にまとめた。

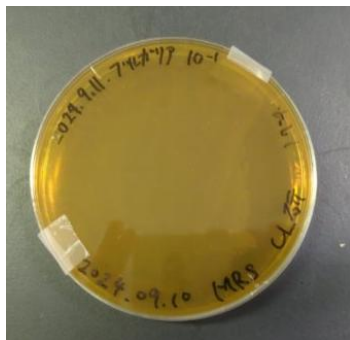


Figure1 ブルガリアヨーグルト 10⁻¹系 MRS 培地の様子

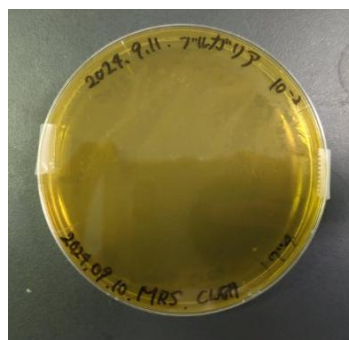


Figure2 ブルガリアヨーグルト 10⁻²系 MRS 培地の様子

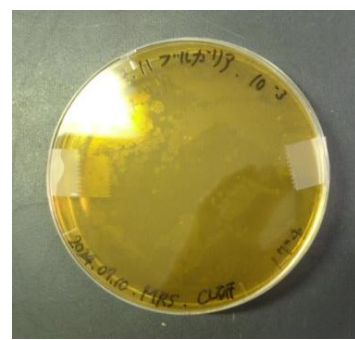


Figure3 ブルガリアヨーグルト 10⁻³系 MRS 培地の様子

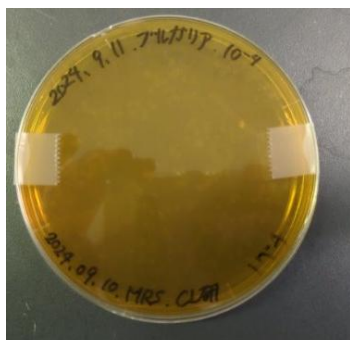


Figure4 ブルガリアヨーグルト 10⁻⁴系 MRS 培地の様子

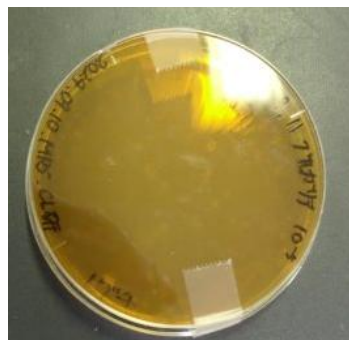


Figure5 ブルガリアヨーグルト 10⁻⁵系 MRS 培地の様子

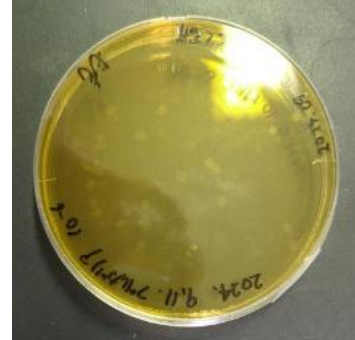


Figure6 ブルガリアヨーグルト 10⁻⁶系 MRS 培地の様子

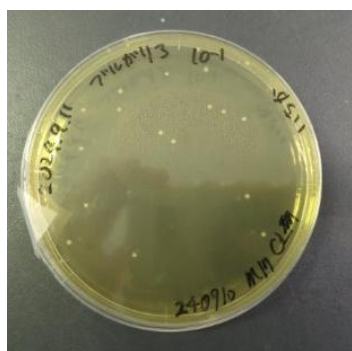


Figure7 ブルガリアヨーグルト 10^{-1} 系 M17 培地の様子

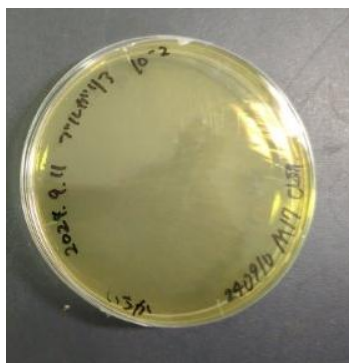


Figure8 ブルガリアヨーグルト 10^{-2} 系 M17 培地の様子



Figure9 ブルガリアヨーグルト 10^{-3} 系 M17 培地の様子

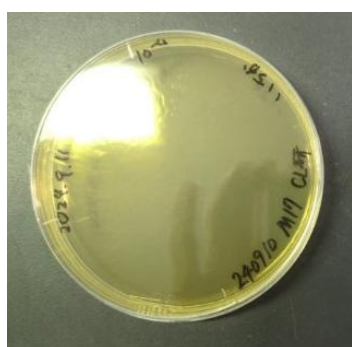


Figure10 ブルガリアヨーグルト 10^{-4} 系 M17 培地の様子

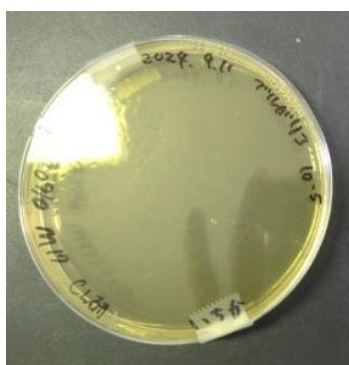


Figure11 ブルガリアヨーグルト 10^{-5} 系 M17 培地の様子

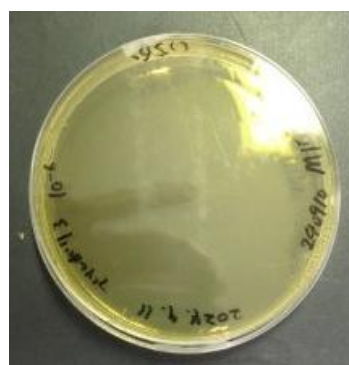


Figure12 ブルガリアヨーグルト 10^{-6} 系 M17 培地の様子

Table2 ブルガリアヨーグルトの培地の様子

	MRS	M17
$x10^{-1}$	全体的にコロニーを確認することができたが、コロニー数が多かった。	コロニーが 16 個確認され、白色で丸く点々としていた。
$x10^{-2}$	全体的にコロニーを確認することはできたが、コロニー数が多かった。	コロニーは確認できなかった。
$x10^{-3}$	まとまったコロニーを確認することができた。コロニーの色は薄かった。	コロニーは 1 個確認することができ、白く丸い形をしていた。
$x10^{-4}$	コロニーは全体的に広がって確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$x10^{-5}$	コロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$x10^{-6}$	コロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。

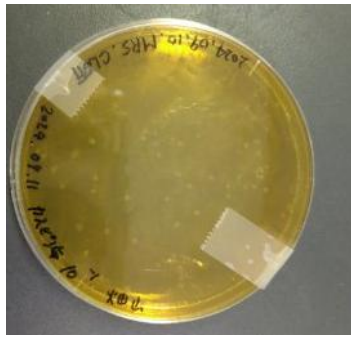


Figure13 カスピ海ヨーグルト 10⁻¹系 MRS 培地の様子

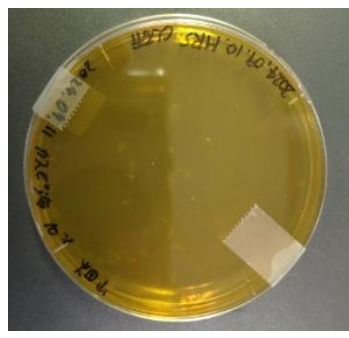


Figure14 カスピ海ヨーグルト 10⁻²系 MRS 培地の様子

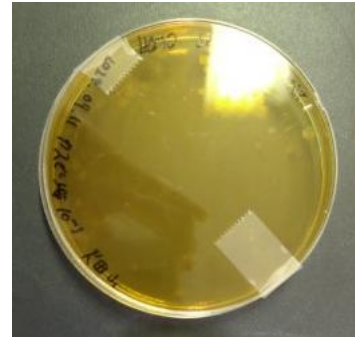


Figure15 カスピ海ヨーグルト 10⁻³系 MRS 培地の様子

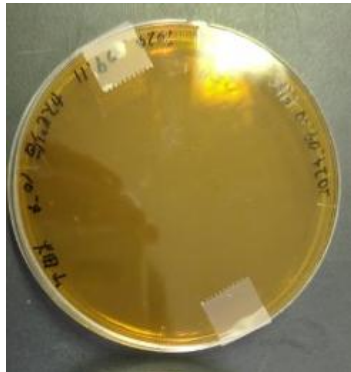


Figure16 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁴系 MRS 培地の様子

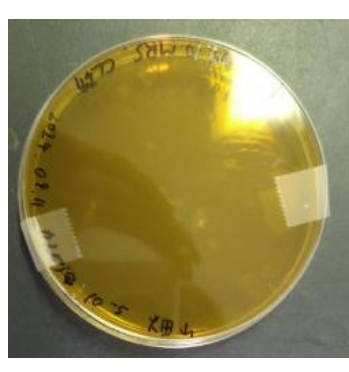


Figure17 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁵系 MRS 培地の様子

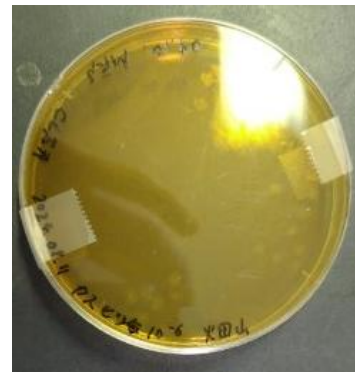


Figure18 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁶系 MRS 培地の様子

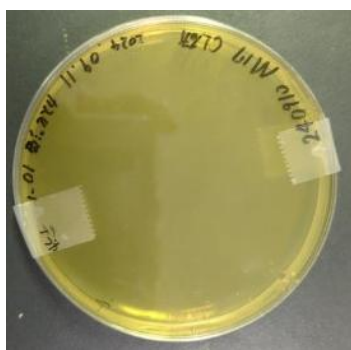


Figure19 カスピ海ヨーグルト 10⁻¹系 M17 培地の様子

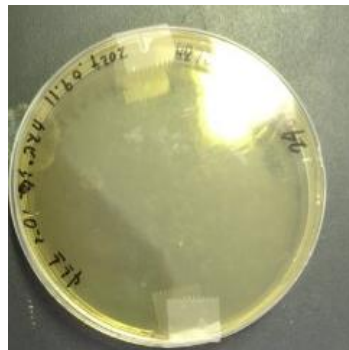


Figure20 カスピ海ヨーグルト 10⁻²系 M17 培地の様子

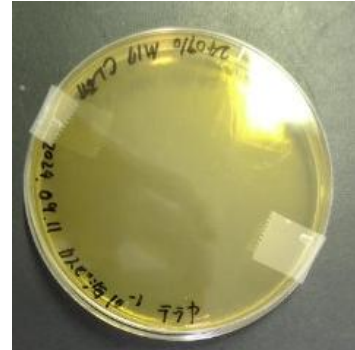


Figure21 カスピ海ヨーグルト 10⁻³系 M17 培地の様子

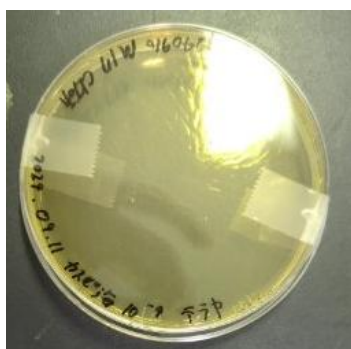


Figure22 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁴系 M17 培地の様子

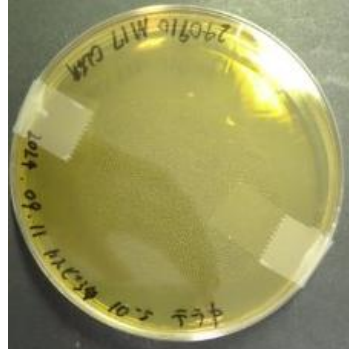


Figure23 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁵系 M17 培地の様子

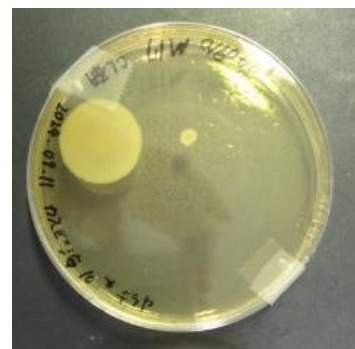


Figure24 カスピ海ヨーグルト 10⁻⁶系 M17 培地の様子

Table3 カスピ海ヨーグルトの培地の様子

	MRS	M17
$\times 10^{-1}$	コロニーを全体的に複数確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$\times 10^{-2}$	コロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$\times 10^{-3}$	シャーレの縁付近でコロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$\times 10^{-4}$	コロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーは確認できなかった。
$\times 10^{-5}$	コロニーを確認することができたが、色は薄かった。	コロニーを1個確認することができた。白色で丸い形をしていた。
$\times 10^{-6}$	シャーレの縁付近でコロニーを確認することができたが、色は薄かった。	非常に大きなコロニーと少し大きいコロニー2個確認することができ、白色であった。その他に小さいコロニーは確認できなかった。



Figure25 Yakult1000 の 10^{-1} 系 MRS 培地の様子

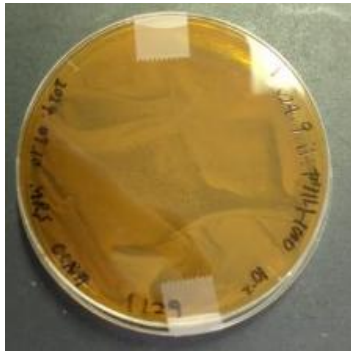


Figure26 Yakult1000 の 10^{-2} 系 MRS 培地の様子

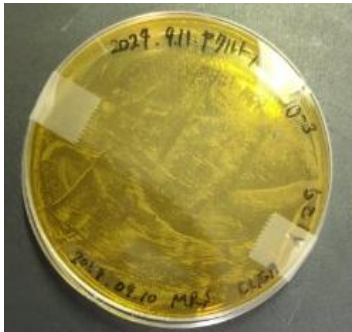


Figure27 Yakult1000 の 10^{-3} 系 MRS 培地の様子

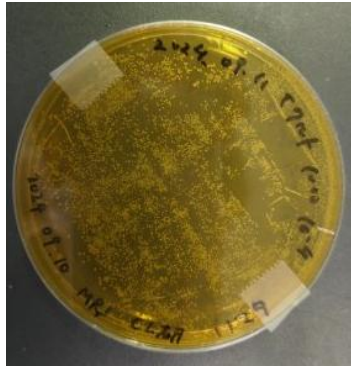


Figure28 Yakult1000 の 10^{-4} 系 MRS 培地の様子

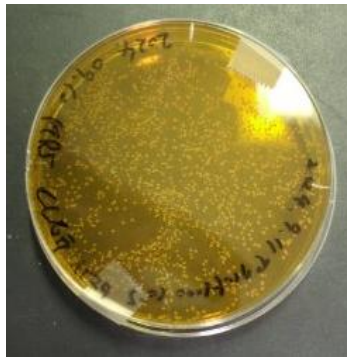


Figure29 Yakult1000 の 10^{-5} 系 MRS 培地の様子

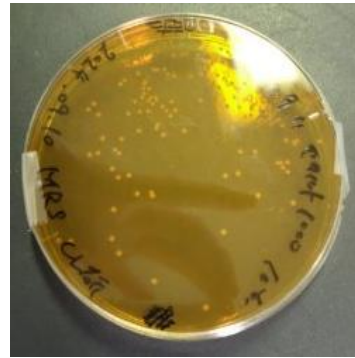


Figure30 Yakult1000 の 10^{-6} 系 MRS 培地の様子

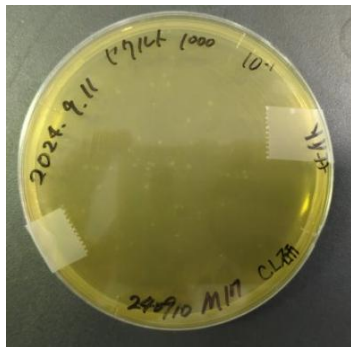


Figure31 Yakult1000 の 10^{-1} 系 M17 培地の様子



Figure32 Yakult1000 の 10^{-2} 系 M17 培地の様子



Figure33 Yakult1000 の 10^{-3} 系 M17 培地の様子

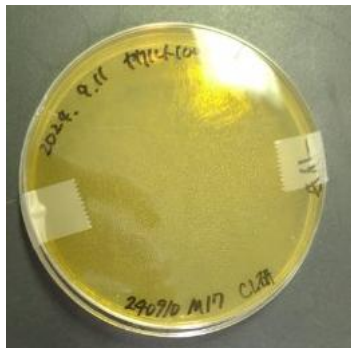


Figure34 Yakult1000 の 10^{-4} 系 M17 培地の様子

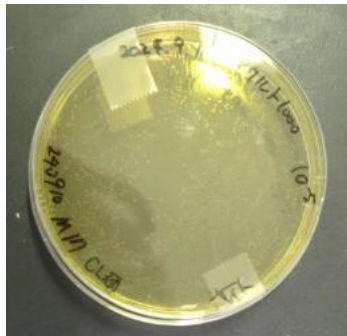


Figure35 Yakult1000 の 10^{-5} 系 M17 培地の様子

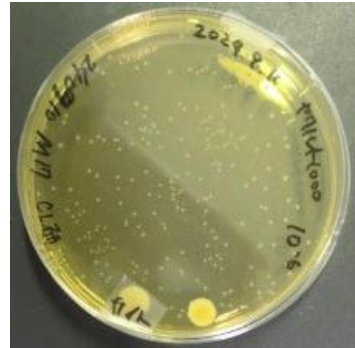


Figure36 Yakult1000 の 10^{-6} 系 M17 培地の様子

Tebble4 Yakult1000 の培地の様子

	MRS	M17
$\times 10^{-1}$	コロニー数を非常に多く確認できた。	全体的にコロニーが確認でき、色は薄い白色で丸い形をしていた。
$\times 10^{-2}$	コロニー数を非常に多く確認できた。	少し大きめのコロニーが5個確認でき、色は白色で丸い形をしていた。その他に小さいコロニーは確認することができなかった。
$\times 10^{-3}$	全体的に多くのコロニーを確認することができた。	大きめのコロニーを1個確認することができた。その他にはコロニーを確認することができなかった。
$\times 10^{-4}$	全体的に多くのコロニーを確認することができた。	コロニーは確認できなかった。
$\times 10^{-5}$	全体的にコロニーを確認することができ、色は白く丸い形をしていた。	全体的に小さなコロニーを複数確認することができた。色は薄い白色で丸い形をしていた。
$\times 10^{-6}$	コロニーを確認することができ、色は白く丸い形をしていた。	小さなコロニーを複数と、大きめのコロニーを2個確認することができた。

カスピ海ヨーグルトの M17 培地、Yakult1000 の MRS 培地と M17 培地の 3 種類の培地から、コロニー数が最も多かった希釈系列の培地を 1 つずつ選定し、そこから培地に存在する全てのコロニーを掻き取って菌液を調製した。この 3 種類の培地選択は、ヨーグルトと乳酸菌飲料に含まれる乳酸菌の違いと、2 種類の培地で培養できる乳酸菌の違いを対照実験するためである。調製した菌液を使用し、微生物の簡易同定キットである API キットを用いて、MRS 培地および M17 培地で培養された菌を同定した。これにより、各試料に含まれる乳酸菌の種類を特定した。下記の Table5 にこれらの結果と同定された菌種についての簡単な説明をまとめた。

Table5 同定された菌種

カスピ海	M17	1. <i>Lactobacillus salivarius</i> 口腔内に存在し、口腔内疾患に対して効果がある。
		2. <i>Lactobacillus acidophilus</i> 腸内や口腔内に分布している。
Yakult1000	MRS	1. <i>Lactobacillus paracasei</i> ヒトの腸内や酪農製品に含まれるチーズから発見された菌。casei: ラテン語でチーズを意味
	M17	MRS と同様。

同定された乳酸菌を含む菌液を使用し、それぞれの菌液を牛乳に接種してインキュベートし、それらの乳酸菌だけでヨーグルトが作られるかを調査した。インキュベート後の状態 (Figure37-39) および pH を Table6 にまとめた。



Figure37 Yakult1000 の MRS 培地ヨーグルト化試験の様子



Figure38 Yakult1000 の M17 培地ヨーグルト化試験の様子

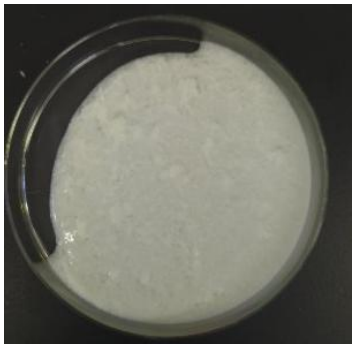


Figure39 カスピ海ヨーグルトの M17 培地ヨーグルト化試験の様子

Table6 ヨーグルト化試験の結果

カスピ海	M17	pH: 4.79 牛乳は一部凝固し、固体と液体の中間のゲル状態であった。においは、酸味のあるにおいがした。
Yakult1000	MRS	pH: 5.99 牛乳は凝固せず、液体の状態であった。においも、培養前の牛乳と変わらなかった。
	M17	pH: 4.57 牛乳は凝固し、固体の状態であった。においは、酸味のあるにおいがした。

5 考察

5.1 ヨーグルト化試験

ヨーグルトにおいて、*Lactobacillus* 属（桿菌）と *Streptococcus* 属（球菌）の共生培養が広く利用されていることは周知の事実である。特に、ヨーグルトのテクスチャー形成においては、*Streptococcus thermophilus* に代表される球菌の代謝活性が、カゼインミセルの等電点凝集を誘導し、特徴的なゲル構造の形成に寄与することが知られている。

一般的な認識として、乳酸菌飲料には球菌が含まれていないと考えられてきた。しかしながら、本実験において Yakult1000 を接種した牛乳でも凝固現象が観察された事実（Table6）は、従来の理解に再考を促す結果となった。

これらの結果は、市販の乳製品における乳酸菌叢の解析の必要性を示唆している。また、ヨーグルト形成における複数菌種の相互作用メカニズムの解明や、単一菌株による発酵におけるテクスチャー形成能の評価も必要な研究課題として浮かび上がってきた。

5.2 市販のヨーグルト中の乳酸菌の培養

本実験において、乳酸菌全般に対する選択性のある MRS および乳酸菌球菌と一部の乳酸桿菌に選択性のある M17 平板培地を用いて、ヨーグルトと乳酸菌飲料の乳酸菌の分離を試みたところ両選択培地からコロニーを確認することができた。この結果から、ヨーグルトと乳酸菌飲料内では乳酸菌の共生関係が存在することが考えられる。ただ、乳酸球菌を含有しないと推察されていた Yakult1000 においても M17 培地での生育が認められたこと（Table4）は、予想外の知見である。

培養過程においては、カスピ海ヨーグルトでは低希釈区でコロニー形成の抑制が、高希釈区で形成効率の向上が観察（Table3 $\times 10^3$ と $\times 10^6$ での比較）された。この現象は、菌体の過密、代謝産物による生育阻害、あるいは栄養素の競合等により起因すると考えられる。これらは、知られていない乳酸菌の増殖特性を示唆しているだろう。

5.3 API キットによる簡易同定

MRS および M17 培地で選択培養した菌株を API キットにより簡易同定した結果、MRS および M17 培地で乳酸桿菌を確認した。一方で M17 培地では乳酸球菌の同定はされなかった。M17 培地は乳酸球菌に選択性があるが、一部の乳酸桿菌も生育することが可能であるため、乳酸桿菌が同定されたのではないかと考える。

5.3 ヨーグルト化試験

ヨーグルト化試験から、MRS 培地では牛乳の pH は低下しなかったため凝固せず、M17 培地では pH4.6 付近まで低下し凝固した。この結果から、M17 培地で選択的培養された菌種は酸を生成し、牛乳を凝固させ、MRS で培養された菌種は酸

を生成しなかったため凝固しなかったのではないかと推測する。参考文献より、乳酸桿菌は、風味となるアミノ酸やペプチドを生成し、球菌の増殖に関与し、乳酸球菌はギ酸など酸を生成しテクスチャーを形成すると共に乳酸桿菌の生育を促進する。そのため、API キットによる簡易同定では球菌を確認することができなかったが、M17 培地にも球菌が含まれていたのではないかと考えられる。また、球菌の存在量は桿菌と比較して少量であったため、同定ができなかった可能性も考えられる。

以上のことから、ヨーグルトの生成には乳酸菌の共生関係は必須条件でなく球菌が存在することで牛乳は凝固するが、共生関係があることで風味やテクスチャーが生成されおいしさが増したヨーグルトが生成されるのではないかと考えられる。

6 今後の展望

本研究の結果を発展させる第一歩として、まず培地条件の改良が挙げられる。現在の固形培地での培養に加え、同じ MRS や M17 の組成を用いた液体培地での培養を行う。液体培地を用いることで、培養上清の pH 測定や濁度測定が容易になり、より詳細な増殖曲線を得ることができる。また、培養温度を 30℃、37℃、42℃と変えることで、各菌株の至適温度も明らかにできるだろう。

次に、検体数の拡張が必要である。現在使用している 3 種類の市販製品の回転数を増やす。特に興味深い結果が得られた Yakult1000 については、別ロットでの再現性を確認することも大切であると考ええる。

ヨーグルト化試験についても、より詳細な条件検討が可能である。今回の実験系に加えて、培養温度や培養時間を変えた際の凝固の程度を比較することで、最適な製造条件を見出せる可能性がある。また、pH メーターでの測定に加えて、粘度計を用いることで、物性の定量的な評価も可能となるだろう。

さらに、分離した菌株の安定性について検討することも重要である。培養を重ねた際の性質の変化や、低温保存後の活性維持についても確認が必要である。

7 参考文献

- [1] 鈴木チセ：食品機能性評価マニュアル集第Ⅲ集，
http://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual/100755_suzukic.pdf
- [2] 熊本県立宇土中学校・宇土高等学校：MRS 培地を用いた乳酸菌の単離，
<https://sh.higo.ed.jp/utosh/wysiwyg/file/download/24/2484>
- [3] biomerieux：API® シリーズ，
<https://go.biomerieux.com/JP/API-User-Support-Main>
- [4] biomerieux：API® 50 CH 簡易使用ガイド，
<https://go.biomerieux.com/SUPC01-2-1-202207>
- [5] biomerieux：API® 50 CH，

https://go.biomerieux.com/Package-Insert-07945-H-ja-50300_202203

[6] biomerieux : API® 50 CHL Medium,

<http://products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/50410F.pdf>

8 謝辞

本研究を進めるにあたり、下記の方々にアイデアおよびアドバイス、実験器具の提供等の支援、ご指導いただきました。ここに感謝の意を表します。

- 食品開発学科, ミルク科学研究室, 川井 泰 教授
- バイオサイエンス学科, 生命工学研究室, 西山 辰也 専任講師
- バイオサイエンス学科, 発酵化学研究室, 渡邊 泰祐 准教授
- バイオサイエンス学科, 発酵化学研究室, 荻原 淳 教授

以上