

玄米乳酸菌液の発酵と単離

熊本県立宇土高等学校

玄米乳酸菌液に存在する乳酸菌をMRS培地を用いて、単離し、培養することができた。
その後、アピ50CHLを用いて、玄米乳酸菌液に含まれる菌の種類をApiweb™で特定することができた。

1. 目的

乳酸菌について調べていると、玄米乳酸菌液というものがあることを知った。玄米乳酸菌液には、生活において利点がたくさんあり、手軽に作れるという情報を得たため、玄米乳酸菌について研究してみたいと思ったから。

2. 方法

実験方法1 MRS培地の作成・乳酸菌の単離

《MRS培地作り》

- ①ビーカーに蒸留水とMRS培地粉末と炭酸カルシウムと寒天 粉末を入れて混ぜ、オートクレーブで15分滅菌する。
- ②滅菌したMRS寒天培地を9枚のシャーレに注ぎ、寒天が固まったら、上下反転にし、蓋についた結露を乾かす。

《玄米乳酸菌液の発酵》

【材料】

- ・ミネラルウォーターまたは蒸留水
- ・玄米(無農薬)
- ・黒糖またはきび砂糖
- ・自然海塩

- ①容器に軽く洗った玄米、黒糖、塩を入れる。
- ②水を入れ、よく混ぜる。
- ③空気が入るように、ラップをふんわりとかける。
・日光の当たる暖かい場所におき、一週間毎日よく混ぜる。

《乳酸菌の単離》

- ①食塩水0.8%と発酵した玄米乳酸菌液を混ぜる。
※その際、1倍、1/10倍、1/100倍の溶液を作る。
- ②①の溶液をMRS培地に塗り広げ、一週間後、培地の反応を見る。

一種類あたりの質量(シャーレ9枚分)

| 試薬等 | 質量 [g] |
|---------|--------|
| 炭酸カルシウム | 1.6 |
| 寒天粉末 | 2.56 |
| MRS | 8.8 |
| 水 | 160 |

玄米乳酸菌液の材料

| 材料 | 質量 [g] |
|-----------|--------|
| ミネラルウォーター | 2000 |
| 玄米 | 150 |
| 黒糖(きび砂糖) | 8.8 |
| 自然海塩 | 160 |

乳酸菌単離用試薬

| 試薬等 | 質量 [g] |
|---------|--------|
| 蒸留水 | 40.0 |
| 塩化ナトリウム | 0.34 |

実験方法2 アピ50CHLを使った実験

《アピ50CHLとは》

49種類の炭素源に対する発酵能が確認でき、菌種同定用ソフトウェアを用い、菌種を特定できる。

- ①培養容器の端に希釈倍率を記入し、トレイに蒸留水を10mLずつ、5箇所に入れる。
- ②プレートを取り出し、1枚ずつ切り離して、5枚のプレート(0-49)を番号順になるよう培養容器に入れる。
- ③実験1で単離した乳酸菌を滅菌綿棒で全て掻き取り、5mLのサスペンションメディウムに入れ調製する。
- ④③の菌液にマクファーランドスタンダードを3滴下する。
- ⑤アピ50CHL培地の入ったアンプルを開け、④の菌液を接種し、均一化する。
※接種した菌液は直ちに使用する
- ⑥ピペットでアピ50CHL培地に調製した菌液を接種する。
- ⑦全てのトレイにミネラルオイルを重層し、プレート用カバーで蓋をする。
- ⑧37℃で48時間、好気条件元で培養する。

3. 結果

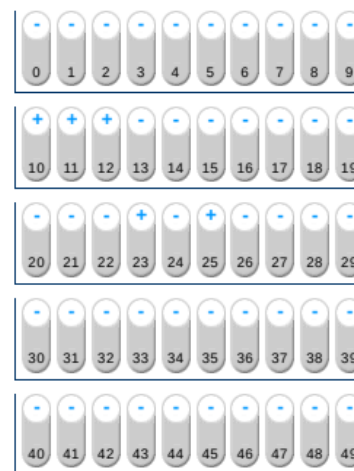
実験方法1 MRS培地・乳酸菌の単離

玄米乳酸菌液には、乳酸菌が存在することがわかった。



実験方法2 アピ50CHLを使った実験

判定方法→試薬が紫色から黄色、(25のみ黒色)に変化したとき+。それ以外は一。



DOUBTFUL PROFILE

| ストリップ | API 50 CHL V5.2 | | | | | | | | | |
|---|-----------------|-------|----------|---------|---------|----------|--|--|--|--|
| プロファイル | -----++++----- | | | | | | | | | |
| 注釈 | | | | | | | | | | |
| 菌種名 | % ID | T | 非典型反応 | | | | | | | |
| Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii | 42.4 | 0.41 | GAL 24% | MNE 81% | AMY 0% | ESC 24% | | | | |
| | | | MAL 75% | SAC 87% | | | | | | |
| Lactobacillus acidophilus 3 | 17.1 | 0.4 | NAG 75% | AMY 1% | MAL 75% | SAC 100% | | | | |
| Pediococcus damnosus 1 | 16.0 | 0.27 | MNE 100% | NAG 99% | AMY 1% | TRE 99% | | | | |
| Pediococcus damnosus 2 | 12.9 | 0.32 | MNE 100% | SAL 94% | CEL 99% | GEN 99% | | | | |
| 次候補 | % ID | T | 非典型反応 | | | | | | | |
| Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus | 4.8 | 0.2 | GAL 25% | AMY 0% | ESC 0% | LAC 98% | | | | |
| 追加試験 | 45℃ | COCCI | | | | | | | | |
| Lactobacillus acidophilus | + | - | | | | | | | | |
| Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii | + | - | | | | | | | | |
| Pediococcus damnosus | - | + | | | | | | | | |

・Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus(ブルガリクス 菌)が検出された。

※ブルガリクス菌→生息場所は、ヨーグルトやチーズなどの酪農製品に限定される。

4. 考察

- ・玄米乳酸菌液に乳酸菌が存在し、この菌がブルガリクス菌であり、ブルガリアヨーグルトに含まれるものと同じものだと考えられる。
- ・玄米を発酵させることで、乳酸菌の反応が見られたことから、発酵玄米を摂ることで、無理なく乳酸菌を摂取することができると考えられる。

5. 感想

今回の実験から100分の1の培地のみ菌種の反応が出たが、なぜ一番希釈している培地だけでしか反応が見られなかったのか疑問に思った。今回の研究を通して、乳製品にはどのような乳酸菌が存在しているのか気になったので、乳製品に存在する菌についても調べ、最終的にはどの乳酸菌が一番体に良いか調べてみたいと思った。また、健康食品として情報発信も行っていきたい。

6. 参考文献

- ・簡単！いろいろ使える！玄米乳酸菌液の作り方
https://www.youtube.com/watch?v=EKtNYWP_3MA
- ・APIWEB
<https://apiweb.biomerieux.com/login>
- ・生物資源データプラットフォーム
<https://www.nite.go.jp/nbrcdbrp/dataview?dataId=ANGE000000002387>