

# 油脂コーティングを用いた乳酸菌の生存率の向上について

熊本県立宇土高等学校  
r-2(30)班

## 要旨

乳酸菌は酸に弱いと言われている。そこでヒトの胃酸内での乳酸菌の生存率を向上させることを目的に、乳酸菌を植物性油脂、動物性油脂の両方を用いて乳酸菌のコーティングを行った。そして、人工胃液の中でさらに培養し生存率の割合を比較した。比較したところ、動物性油脂コーティングの乳酸菌の生存率がチョコレートコーティングの生存率を超え最も高いことが確認された。そして乳酸菌の生存率を高めることで食品や薬品に健康効果をもたらすことが可能になる。

## 1. 目的

ロッテと日東薬品工業の共同研究で確認された「乳酸菌のチョコレートコーティングで生存率が100倍向上する」という研究結果を元に、他に新たにコーティングできるものを解明し乳酸菌の胃酸内での生存率を向上させることを目的とする

乳酸菌の生存率向上は、乳酸菌が生きたままの状態が腸まで届くことにより、プロバイオティクスとして多くの人に健康効果をもたらすことが期待される

## 2. 方法

### MRS培地とは (先行研究から引用)

MRS 培地は代表的な乳酸桿菌(Lactobacillus 属) の選択培地である。選択性は低い、現在多くの研究で使用されており、37°C培養にて乳酸菌を培養することができる

### 実験方法(1) 乳酸菌の培養

#### MRS培地作成・乳酸菌培養方法

- (1)ピーカーに蒸留水と 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(121°C2 気圧)で 15 分滅菌する
- (2)滅菌した MRS 培地の半分を約 20 mL ずつ 4 枚のシャーレに入れる
- (3)試料をガラスシャーレに入れる
- (4)蒸留水と食塩を混ぜ、0.85%食塩水を調整する
- (5)試料を含むガラスシャーレに 0.85%食塩水を10ml入れ、懸濁
- (6)5の懸濁液から 1.0mL とってシャーレに入れ、9.0mLの滅菌食塩水を加え 1/1,1/10,1/100,1/1000 と順次希釈列を作製する  
このときシャーレを回してよく混ぜる
- (7)1の残り半分のMRS寒天培地を約20mlずつすべてのガラスシャーレに注ぎ、よく混ぜて静置する
- (8)寒天が固まったら上下反転して蓋についた結露を乾かす。
- (9)すべてのシャーレを 37°Cで 24 時間培養する
- (10)コロニーが発生したシャーレのみクリーンベンチ内で単離し、あらかじめ作っておいた2のMRS寒天培地に画線塗抹し、37°Cで24時間再培養する

表.1 試料1種類あたりの準備物(シャーレ8枚分)

試薬等	質量(g)
試料	0.50
蒸留水(培地用)	160.00
MRS培地粉末	8.80
炭酸カルシウム	1.60
寒天粉末	2.56

表.2 乳酸菌単離用試薬

試薬等	質量(g)
蒸留水(0.85%食塩水)	40.00
塩化ナトリウム	0.34

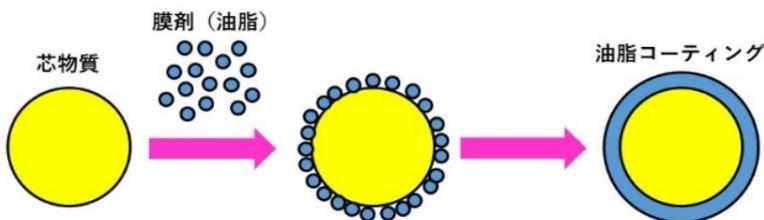
### 実験方法(2) 乳酸菌数の測定

#### 乳酸菌数測定用プレートでの測定

- プレート内に発生する赤い斑点の数で乳酸菌数を測定することができる
- (1)乳酸菌を同定するための試料であるヨーグルトMRS培地作成方法・乳酸菌単離方法の手順1~10で乳酸菌を培養させる
  - (2)蒸留水と MRS 培地粉末を混ぜ、オートクレーブ(121°C,2 気圧)で 15 分滅菌した MRS 液体培地を蓋付き試験管に分注する
  - (3)1のコロニーを白金線で掻き取り、MRS 液体培地に接種、調製
  - (4)3の検液をピペットで乳酸菌数測定用プレートに接種し、気泡が入らないようにフィルムを下ろし、検液を均一に広げる
  - (5)フィルムを 37°Cで 48 時間培養する

### 実験方法(3) コーティング

#### 乳酸菌の油脂コーティング方法・人工胃液実験



食用油脂	植物油脂	動物性油脂	加工油脂
植物油	サフラワー油・ひまわり油・大豆油・綿実油・ごま油・なたね油・米ぬか油・とうもろこし油・落花生油・オリーブ油	動物油	マーガリン・ショートニング
植物脂	ヤシ油・パーム油	動物脂	
動物性油脂	魚油・肝油など	動物脂	
	バター・豚油(ラード)・牛脂(ヘット)		

- (1)バター、生クリームを液状にし、フラットシャーレに入れる
- (2)マイクロピペットで乳酸菌を取り出し、(1)に入れる
- (3)人工胃液を(2)に入れ混ぜる
- (4)37°Cで24時間再培養する

○人工胃液(pHは約1.2 を使用)

→日本薬局方 溶出試験法に記載の第1液を使用  
塩化ナトリウム0.2gを塩酸0.7ml及び水に溶かして100mlとする



### 実験方法(4) 乳酸菌数の測定

(2)で用いた方法を用いて生存率を比較する

## 3. 結果

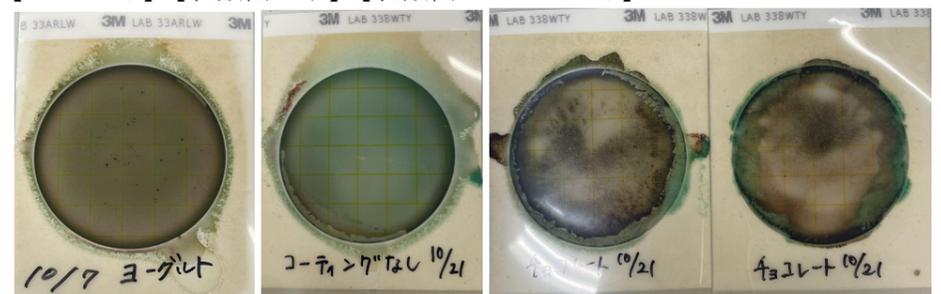
実験(1)(2)の結果

### (1)乳酸菌の培養

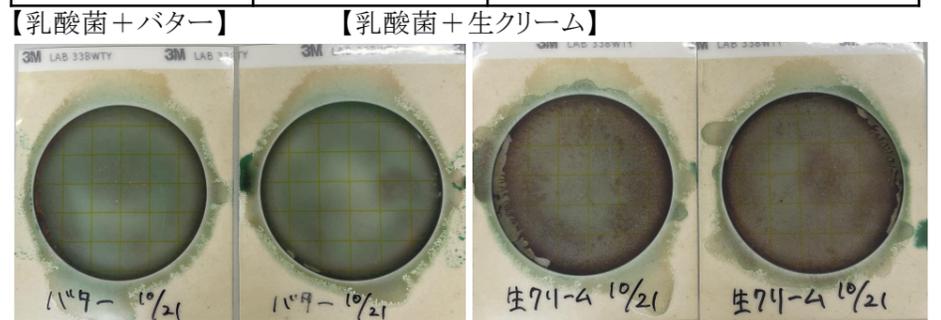
試料である【ヨーグルト】から乳酸菌をとり乳酸菌だけを培養することに成功

### (2)乳酸菌数の測定 赤色の斑点を確認＝乳酸菌を確認とみなす

【ヨーグルト】 【乳酸菌のみ】 【乳酸菌+チョコレート】



培養を確認	死滅を確認	培養を確認(生存)
【乳酸菌+バター】	【乳酸菌+生クリーム】	



乳酸菌の生存は確認されたが中心部から逃げるような分布確認	乳酸菌の生存が最も高いことが確認
------------------------------	------------------

## 4. 考察

乳酸菌が油脂でコーティングされることにより、チョコレートよりも乳酸菌の表面の胃酸に対するガードが強くなったのではないかと

## 5. 感想

今回乳酸菌の培養に伴ってコンタミネーション(異物混入)を数回繰り返してしまった。そのことからシャーレをプラスチックシャーレからガラスシャーレに変更し、オートクレーブを用いて高熱で滅菌をした。そしてこれらをクリーンルーム内で行い、コンタミネーションを防ぐことに成功した。そして先行研究においてチョコレートコーティングで生存率100倍向上することが分かっていたが、今回の研究を通して植物性油脂でコーティングをすることで生存率がチョコレートよりも向上することがわかった。

## 5. 参考文献

- チョコレートを含むことで生存率が100倍上昇する  
<https://www.nof.co.jp/contents/business/food/coating/summary/index.html>
- チョコレートでとる乳酸菌 乳酸菌を腸で活躍させるために  
[https://www.kyo.or.jp/kyoto/pdf/z07\\_151222\\_nitto\\_kaiinpress.pdf](https://www.kyo.or.jp/kyoto/pdf/z07_151222_nitto_kaiinpress.pdf)
- チョコレートで包むことで乳酸菌の生存率が向上することを確認  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/56/1/56\\_551210/\\_pdf-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/56/1/56_551210/_pdf-char/ja)
- 人工胃液、崩壊試験第1液pH1.2/溶出試験第1液pH1.2(×10)  
<https://prtmes.jp/main/html/rd/p/000000587.000002360.html>
- <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0106-0644.html>