



食品の醗酵にかかわる菌の研究

福島大学附属中学校

2年 錫谷 智

【動機・目的】

私たちは毎日たくさんの醗酵食品を食べています。日本古来の食品としては大豆を醗酵させて作る納豆、味噌、醤油、米を醗酵させた酢や日本酒、そしてカツオを醗酵させた鰹節などです。また、外国から伝わった食品にも牛乳を醗酵させたヨーグルトやチーズ、そして小麦を醗酵させて作るパンやビールがあり、醗酵食品を食べない日はありません。このような醗酵は目には見えない微生物によって行われることを私たちは知っています。でも、微生物の存在を知らない時代から人類は食物を醗酵させてきました。ヨーロッパでは7,000年も前からヨーグルトが作られてきたそうです。また、エジプトではピラミッドの建設作業を終えた夜、人々がビールを飲んで1日の疲れを癒したそうです。この時代の人達が醗酵をどのようにとらえ、どのように発展させてきたのかを考えると、とても不思議であると同時に、古代の人達の知恵に驚かされます。

一方、食品を保存する技術として、現代の我々は冷蔵庫や冷凍庫で保存するのが一般的ですが、こういった機械のない時代には醗酵させる他、乾燥させて干物にする、塩を加えて漬物にする、酢でしめるなどといった方法が広く行われてきました。これは菌による腐敗を防ぐ方法ですが、塩づけした浅漬やキムチでは沢山の乳酸菌が増えて酸っぱくなるということが知られています。つまり、こういった技術は腐敗の原因菌を抑えながら、健康に良い菌は増やして醗酵させているということになります。

このような食品の保存と微生物の関係を知るため、醗酵にかかわる微生物の性質を調べてみることにしました。

【材料と方法】

1 食品からの菌の分離と培養

微生物が生きたまま存在する納豆、ヨーグルト、ドライイーストから菌の分離培養を行った。培養には乳酸菌用の培地・BL培地とカビ用の培地・ポテトデキストロース培地を用いた。上記の食品を培地に塗り、窓を閉め切ったサンルームに設置した段ボール箱の中で遮光して培養した。サンルームの温度は外気温によって変化するものの、30~40℃になった。

2 微生物の食品での培養と定量

今回調べた食品の材料である大豆（豆乳）、牛乳、小麦粉を使って菌の培養を行った。牛乳や豆乳は無菌の試験管に入れ、そこに少量の菌を加えて培養した。小麦粉は生理食塩水（0.9%の食塩水）に小麦粉を加え、60℃で1時間加熱して消毒してから、菌を加えて培養した。60℃の保温は炊飯器の保温機能を使った。

3 pHの測定

菌が増殖した後の培地のpHやpHの異なる牛乳の作成には、pH測定用のろ紙を用いた。pHの異なる牛乳は酢を加えて調整した。

4 菌の顕微鏡での観察

菌はグラム染色をして顕微鏡で1,000倍に拡大して観察した。グラム染色の手順は以下のとおりである。

- ①観察したい検体をスライドガラスに塗り広げ、乾燥させた。
- ②ガスバーナーで加熱して固定した。
- ③グラム液で1分間染色後、水洗。
- ④ヨード液で1分間処理後、水洗。
- ⑤アルコールで30秒間脱色。
- ⑥サフラニン液で1分間染色後、水洗。

5 菌数の計測

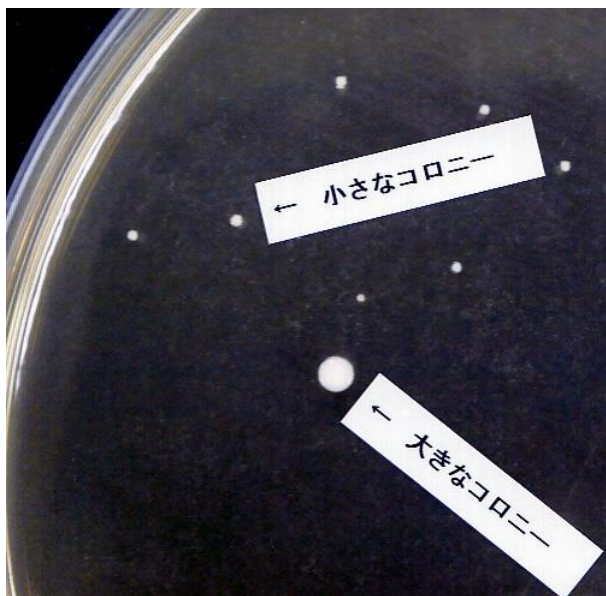
まず、検体1mlを水9mlに加えて10倍に希釈した。この希釈を連続的に行って100倍希釈、1,000倍希釈のように10倍階段希釈を行った。それぞれの濃度の希釈液1mlを培地表面に塗布し、1～2日培養後、培地表面にできたコロニー数を数えて検体中の菌数を測定した。

【結果】

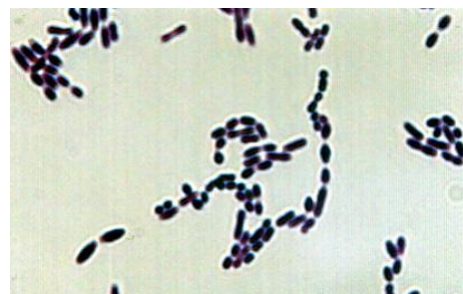
実験1 ヨーグルト、納豆、ドライイーストからの菌の培養

ヨーグルトは乳酸菌用培地であるBL培地、イーストはカビや酵母用の培地であるポテトデキストロース培地にうえた。納豆菌がこれらの培地で増えるかどうかは分からなかったため、両方の培地で培養してみた。

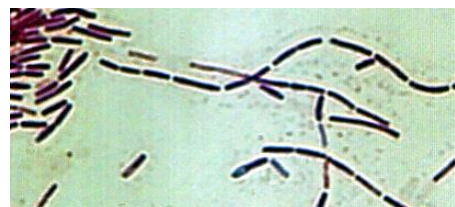
その結果、ヨーグルトからは大小2種のコロニーを作る菌が増えた(図1)。これらの菌を顕微鏡で観察したところ大きなコロニーは棒状の(以下L菌と呼ぶことにする)、小さなコロニーは球状の菌(以下S菌と呼ぶ)であることが分かった。納豆菌はどちらの培地にも大きなコロニーを作り、顕微鏡ではS菌やL菌よりもやや大きな棒状の菌が見えた。ドライイーストから増やした酵母は上記の3種の菌に比べて直径が数倍大きな微生物で、菌から芽が出て増える様子が観察できた。



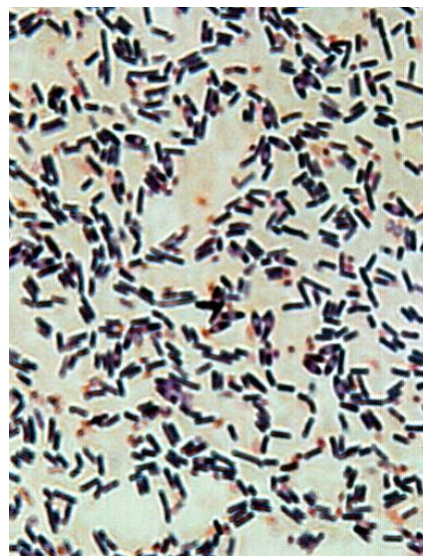
ヨーグルトの培養



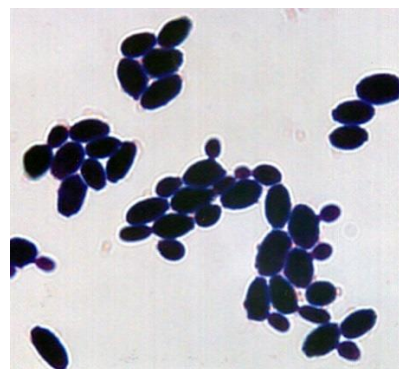
小さなコロニーを作った菌 (S 菌)



大きなコロニーを作った菌 (L 菌)



納豆の培養



ドライイーストの培養

図1. 培養できた菌のコロニーと菌の形状

実験2 牛乳、豆乳、小麦粉での菌の培養

ヨーグルトを作る菌は牛乳を、納豆菌は大豆を、パン酵母は小麦粉を発酵させる菌である。そこでこれらの菌が別の食材でも増えることができるかどうかを牛乳、豆乳、小麦粉で調べてみた（表1）。

表1. それぞれの食材で1日培養した各菌の菌数（万個 / ml）

	牛乳	豆乳	小麦粉
S 菌	1800	45000	失敗
L 菌	3300	32000	7800
納豆菌	2000	18000	18000
パン酵母	22	1500	11000

いずれの菌も牛乳、豆乳、小麦粉全てで増殖できたが、

- ① なぜかS菌を小麦粉で増やした時だけ、とても臭い、変な形をしたコロニーが出てきたため、S菌が小麦粉で増殖できるか調べることができなかった。
- ② どの菌も豆乳で牛乳の9倍以上増殖が良かった。また、小麦でも牛乳より良く増えていた。
- ③ 納豆菌は牛乳、豆乳、小麦粉いずれでも他の菌にそん色なく増えた。
- ④ 一方、酵母はパンを作る微生物であるだけあって、小麦粉での増殖は良いが、豆乳では小麦粉の1/10以下、牛乳では1/100の増殖しか認められなかった。

S菌を増やした時に小麦粉で増えたコロニーを染色して菌を観察したところS菌とは形の違う菌が増えており、むしろ納豆菌に似た形の菌だった(図2)。小麦粉に付着していた菌と思われるが、どうしてS菌を培養した時だけこの菌が増えたのかは分からなかった。

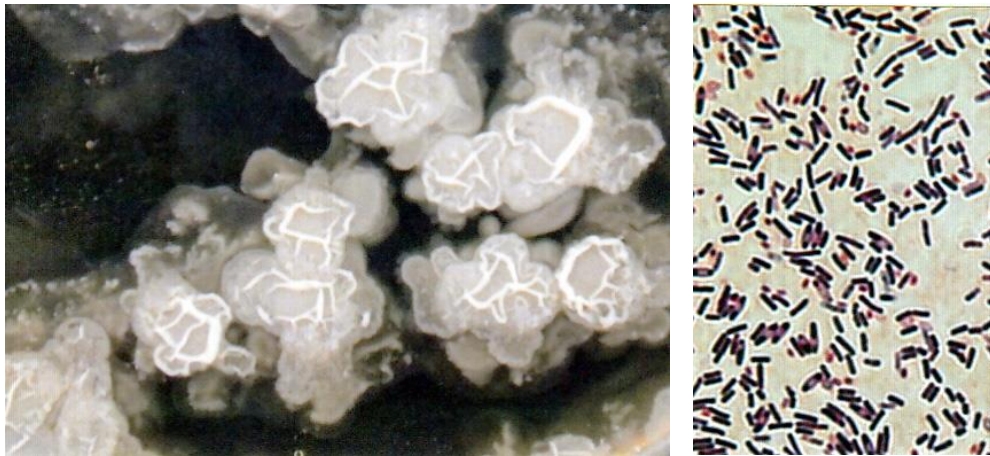


図2. S菌を小麦粉で増やした時に増えたコロニーと菌の観察

実験3 ニンニクの抗菌活性

小学校6年の夏休み自由研究で、すりおろしたニンニクには強い抗菌活性があることを明らかにした。一方、たくさんニンニクが入っているキムチでも乳酸菌は増えているという。そこで、今回調べている4菌種に対してニンニクが効くかどうか調べた。

培地の表面一面に菌を塗った後、すりおろしたニンニクを真ん中に少量おいて1日培養した。その結果、ニンニクによってどの菌も増殖を抑制され、ニンニクの周りに菌が増えられないゾーンができた。その直径を測ったところS菌では2.2 cm、L菌では2.0 cm、納豆菌では5.5 cm、パン酵母では4.5 cmあり、納豆菌 > パン酵母 > L菌 > S菌の順でニンニクによって増殖が抑制されることが分かった。

実験4 菌の増殖による培地のpHの変化

漬かり過ぎた漬物が酸っぱいことやヨーグルトが酸っぱいことから分かるように、菌によっては増殖すると酸を作るものがある。我々が酢でしめて腐敗を防ぐことから、この酸が食品の保存に関係するものと思われる。そこで、今回研究している4菌種が増殖とともに酸を作る菌かどうかを各食材で培養した前後のpH変化から調べることにした。

S型菌が増えた豆乳はpH3.0にまで酸性化し、豆乳も固まっていた(表2)。この菌が牛乳や小麦粉で増えたときにこの酸性化は認められないことから、栄養素によって酸の

産生量は大きく異なることが分かった。ヨーグルトを作る2つの菌が牛乳を酸性化しないことは不思議だった。

表 2. 培養前後での食材の pH の変化

	牛乳 (pH6.4)	豆乳 (pH7.0)	小麦粉 (pH6.4)
S 菌	6.4	3.0	6.7
L 菌	6.4	6.7	5.8
納豆菌	6.7	6.4	6.1
パン酵母	6.4	6.7	6.4

そこで、牛乳にヨーグルトを作る2つの菌両方を入れて培養してみた。対照実験として菌を入れない牛乳、ヨーグルトを少し加えた牛乳の培養も行い、pH の変化と牛乳の変化を観察した (表 3)。S 菌、L 菌単独では牛乳をさほど酸性化しなかったし、固形化することもなかった。しかし、S 菌と L 菌両方加えると、ヨーグルトを入れた時と同じように、牛乳を酸性化し、固定化した。加えたヨーグルトは pH 5 だったが、牛乳に加えてできたヨーグルトは pH 3.0 だった。

表 3. 各菌による醗酵後の牛乳の pH

	牛乳	S 菌	L 菌	S 菌+L 菌	ヨーグルト
pH	6.7	6.1	6.7	3.5	3.0

実験 5 pH を変えた牛乳での菌の増殖

実験 4 では菌が増殖する際に菌が酸を作るかどうかを調べたが、次に今回調べた 4 菌種が酸性にした牛乳で増えられるかどうかを調べた。酢を滴下して pH 5.0、pH 3.5 にした牛乳で培養し、何も加えない牛乳 (対照実験) での増殖を 100% とした時の比率を表 4 にまとめた。

pH 3.5 では納豆菌やパン酵母はかろうじて生きた菌の検出ができたが、ヨーグルトから分離した菌は両方とも菌を検出できなかった。今回調べたヨーグルトと同じ pH 5.0 ではヨーグルトから分離した L 型菌が牛乳 (pH 6.4) の 4.9 倍も良く増え、この菌が pH 5 程度の酸性環境を好む菌であることが分かった。豆乳を pH 3 にまでした S 菌が弱酸性の牛乳では増えられないことは興味深い結果で、もしかすると菌の増殖が終わってから酸の酸性が続いているのかもしれない。パン酵母は酸性条件下でも比較的よく増えたが、納豆菌はほとんど増えなかった。

表 4. pH を変えた牛乳での菌の増殖
(コントロールに対する%)

	pH 5	pH 3.5
S 菌	(-)	(-)
L 菌	490	(-)
納豆菌	0.25	0.005
パン酵母	19.3	0.25

実験6 ヨーグルトでの納豆菌、パン酵母の培養

実験5でパン酵母は酸性の条件下でも少し増えられたので、乳酸菌が増えてできたヨーグルトの中で増えることができるかどうかを調べてみた。使ったヨーグルトのpHは5だった。また、菌数を測定したポテトデキストロース培地でL菌は増えられないこと、S菌は増えはするが非常に小さなコロニーを形成し、納豆菌やパン酵母のコロニーとは区別出来るため、菌数測定に影響がないことは予備実験で確かめた。

培養した結果、対照の牛乳に比べ、ヨーグルトで納豆菌は100分の1程度しか増えられないものの、パン酵母は5倍良く増えることが分かった。この結果は実験5でパン酵母はpH5の牛乳でも比較的良好に増えられたこととも一部合致したが、既に栄養を乳酸菌などで分解されたヨーグルトでむしろ良く増えるようになったことは大変興味深い結果であった。

実験7 食塩濃度と菌の増殖

漬物を始め、食品保存のために食塩を加えることは広く行われている。しかし、そういった漬物が醗酵して酸っぱくなるのは乳酸菌のせいである。そこで、今回調べている菌が食塩を加えた牛乳で増殖できるかどうかを調べた。食塩は海水濃度と同じ3%とさらに濃い10%、15%になるよう加えた。

ヨーグルトから分離した2菌種のうち、S菌は3%の食塩濃度でほとんど増殖できなかった(図3)。一方、L菌は10%の食塩濃度でも良く増えた。納豆菌は食塩10%でも増殖能を保つ菌であり、パン酵母は10%では増殖が悪くなった。食塩15%で全ての菌は増殖できなかった。

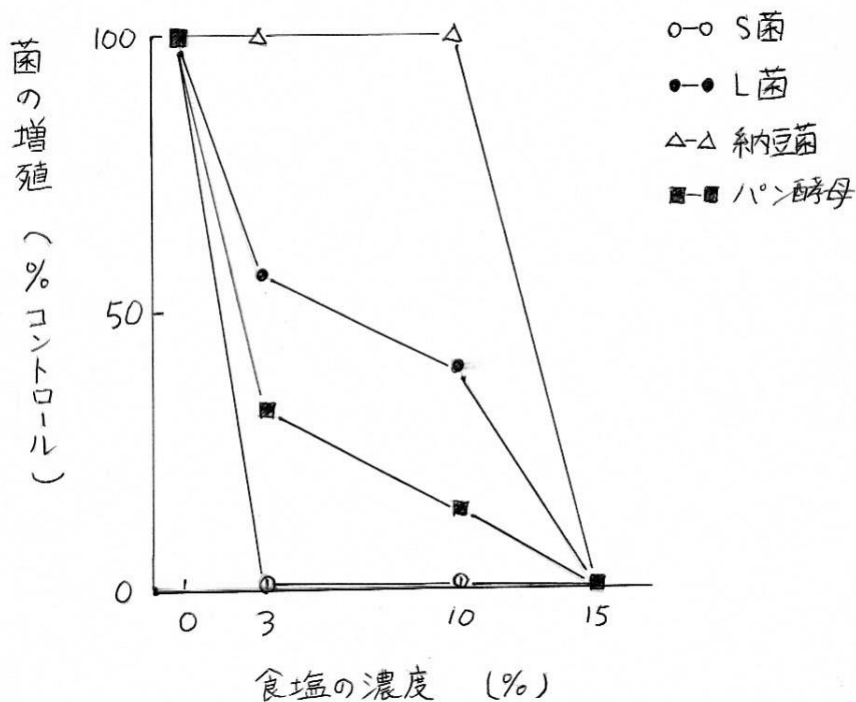


図3. 食塩濃度と菌の増殖の関係

【考察】

ウィキペディアによると生物がエネルギーを得るために酸素を利用するのが呼吸、酸素を使わないのが醗酵ということである。また、腐敗と醗酵は同じ現象であるが、人にとって有用な場合のみを醗酵と呼ぶらしい。今回の実験をとおして、人がいかに食品の腐敗を防いで長期保存することに工夫を凝らしてきたか、そしてその過程で醗酵させながら腐敗を防ぐ方法を見つけ出したかがわかり、先人の知恵に感心した。

今回の実験には明治のブルガリアヨーグルトを使ったので、明治のホームページで調べたところ、ヨーグルトにはラクトバチルス・ブルガリクスという菌とストレプトコッカス・サーモフィラスという菌が使われていると書かれていた。本で調べたところラクトバチルスというのは日本語で乳酸桿菌と呼ばれる菌で、棒状の形をしていること、一方、ストレプトコッカスという菌はレンサ球菌と呼ばれる菌で球状の菌がつながって見える菌であることが分かった。今回調べたS菌は球状、L菌は棒状であったことから、S菌がストレプトコッカス・サーモフィラス、L菌がラクトバチルス・ブルガリクスであると考えられる。

乳酸桿菌という菌は“乳酸菌”と呼ばれる菌の1種である。つまりL菌が乳酸菌である。今回調べたS菌とL菌の性質を見てみると、豆乳ではあるが醗酵させて酸性にしたのはS菌で、ヨーグルトを酸っぱくしているのは主にS菌の作用と考えられた。また、漬物には乳酸菌が豊富に存在するというが、L菌が食塩の濃度が10%もある条件でも増えられたという実験結果は事実と良く一致した。また、ニンニクの抗菌効果が納豆菌やパン酵母に比べてL菌（乳酸菌）に効きにくいという実験3の結果もニンニクが沢山入っている漬物・キムチに乳酸菌がたくさん入っているという事実ともよく一致する。漬物に存在する菌は野菜に付着している菌であると考えられるが、保存のために加えた塩や、調味の目的で加えるニンニクが野菜から持ち込まれる菌の中から乳酸菌を増やす条件になっているということは興味深い。

牛乳にヨーグルトやS菌とL菌を加えてヨーグルトを作ったところ、買ってきたヨーグルトのpHは5であったのに、そのヨーグルトで醗酵させた牛乳はpH3になった。メーカーでは何か工夫して酸っぱくなり過ぎないように醗酵の仕方をしていると思われた。牛乳では豆乳に比較して全ての菌の増殖が悪かった。特にパン酵母の増殖は豆乳の1.5%、小麦粉の0.2%だった。これは牛乳の栄養成分が豆乳より少ない可能性と、牛乳には菌の増殖を抑える成分が入っている可能性が考えられた。パン酵母が牛乳よりヨーグルトで増えやすいという結果も興味深い結果で、醗酵することによってもととの牛乳に足りない栄養成分が新たに産生された可能性と菌の増殖を抑える成分が分解された可能性が考えられる。

研究をとおし、身近な生活の中で物質の化学変化が起きているのを実感し、興味がわいた。今後も他の化学変化が身の回りで起こっていないか意識しながら生活したい。また、乳酸菌などの菌による醗酵が味を変えたり、食品の長期保存を可能にするなど微生物は小さいながら大きなパワーを秘めていることに驚いた。