

# 発酵食品を使った微生物実験の導入方法の検討

木澤祥恵

筑波大学生命環境科学等支援室 (応用生物化学系)

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

## 概要

微生物を初めて扱う学生を対象とした実験のテンプレートとして、発酵食品から微生物を単離して観察する方法を取り上げ、使用する発酵食品、培地、培養方法を検討した。常温および冷蔵品として流通している発酵食品を選び、無菌的にプレートにストリークして好気培養と嫌気培養を行い、限られた時間でより観察がしやすい条件を検討した。

## 1. はじめに

資源微生物実験 (生物資源学類 3 年生・1 学期)、バイオテクノロジー基礎実験 (生物資源学類 2 年生・集中)、応用生物化学実験 II (生物学類・2 学期) 等の学生実験補助を行っており、各学類の学生が微生物に初めて接する場に立ち会う機会が多い。今年度は初めて「夏休み自由研究お助け隊」<sup>1</sup>に参加する機会をいただいたこともあり、実際に身近な発酵食品から微生物を分離する方法について検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1 試料

常温および冷蔵品として流通している発酵食品を試料とした。常温で流通しているものではビール (アサヒスーパードライ®)、醤油 (キッコーマン丸大豆しょうゆ®)、味噌 (生協有機大豆みそ®)、冷蔵品では納豆 (生協小粒納豆®)、ヨーグルト (生きて届けるビフィズス菌ヨーグルト/yoplait®)、チーズ (フランス産ブリー、ノルウェー産ブルー)、糀 (綿引秀一糀店)、酒かす (月桂冠 (株))、キムチ (東海漬物 (株)) を用いた。

### 2.2 培地および培養方法

今回の実験では幅広い種類の微生物を分離するため、酵母、カビを培養するとき一般的に使われるマルト培地を使用した。嫌気培養にはこの他に乳酸菌数測定に用いられる BCP 加プレートカウントアガール (日水製薬株式会社製) を用いた。組成を表 1 に示す。

試料をオートクレーブ滅菌 (121°C 20 分) した 0.8% 生理食塩水に懸濁し、火炎滅菌した白金耳を用いてプレートにストリークした。30°C で静置培養を行い、2 日から一週間観察を行った。

また、同じ条件で培地を半量にしたプレートを用いてストリークを行い、残りの培地を適温に溶かしてその上から重層して嫌気的な条件とし、同様に培養、観察を行った。

### 2.3 前培養の必要性和その方法

実際に培養を開始してみたところ、納豆やヨーグルトでは 2 日~3 日でコロニーが観察できたが、他の試料については生理食塩水に懸濁しただけではコロニーの発生がみられず、あるいはコロニーの発生までに一週間近くを要した。一般的な土壌から微生物をスクリーニングする時よりも明らかに生育が悪いため、これは試料の中の微生物が少ないと考えるより培養条件を見直す必要があると考え、前培養を行った。

液体培地 (プレート用のマルト培地に寒天を添加せず、液体のままオートクレーブ滅菌したもの) を 10ml 入れた大型試験管に火炎滅菌した葉サジで試料を添加し、綿栓を付して試験管振とう機で 30°C 2 日間 (250rpm) 培養を行い、これを前培養とした。培養液を白金耳でプレートにストリークして培養したところ、冷蔵品の試料では微生物の生育が早く均一となり、バクテリアや酵母で 2 日、カビで 4 日でコロニーの観察が可能になった。

表 1 培地組成

培地名	組成 (/蒸留水1000ml)	pH	Agar
Malt培地 (マルト培地)	麦芽エキス 20.0g	6	2%
	ペプトン 1.0g		
	ブドウ糖 20.0g		
乳酸菌分離用寒天培地	酵母エキス 2.5g	7	1.5%
	ペプトン 5.0g		
	ブドウ糖 1.0g		
	ポリソルベート80 1.0g		
	L-システイン 0.1g		
	ブロムクレゾールパープル 0.06g		

<sup>1</sup> <http://www.tech.tsukuba.ac.jp/otasuke.html>

### 3. 結果

#### 3.1 常温流通品からの微生物の単離

常温流通品のビール、醤油、味噌からはコロニーの発生は認められなかった。流通中の過発酵、雑菌の混入などを防ぐための熱処理、ろ過、殺菌剤の添加などによる措置のためと考えられるが、流通品と自家製味噌の比較、冷蔵で流通する濁り酒などとの比較をしてみると新たな考察が得られることも期待される。

#### 3.2 冷蔵流通品からの微生物の単離

##### 3.2.1 納豆

学生実験でも多く使用しているが、好气的条件で比較的容易に生育が可能な *Bacillus.sp* が主であり、その場でサフラニン染色を行い顕微鏡で観察できる。今回は嫌気培養も行ってみたが、生育は見られなかった。(図1)

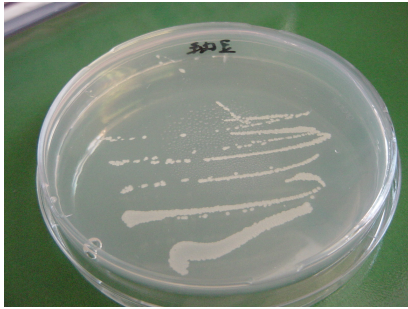


図1

##### 3.2.2 ヨーグルト

こちらも学生実験で多く使用するが、納豆とは対照的に好气的条件では生育せず、嫌气的条件で生育する乳酸菌を多く含む。マルト培地を重層したシャーレでは、肉眼でのコロニー観察は出来ても写真に写りにくく観察しづらいため、BCP カウントアガール培地に生育したコロニーを示す。BCP カウントアガール培地にはブロムクレゾールパープルが含まれており、乳酸菌の生産する酸により pH が低下すると培地の色が紫から黄色へ変化する。(図2)

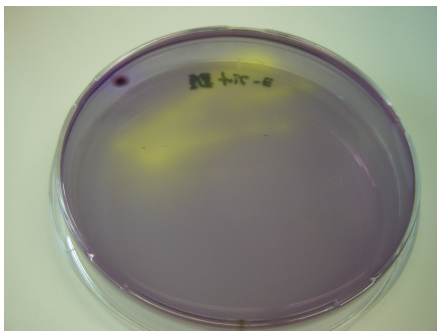


図2

##### 3.2.3 チーズ

カビの生育を期待してブルーチーズとブリーの2種類を使用した。ブルーチーズではカビのコロニーのみ確認された(図3-1)のに対し、ブリーでは好气的なカビの生育とともに乳酸菌の生育が認められた(図3-2)。チーズも製法がさまざま、いろいろな種類の微生物を分離する可能性があり興味深い。



図3-1 ブルーチーズ

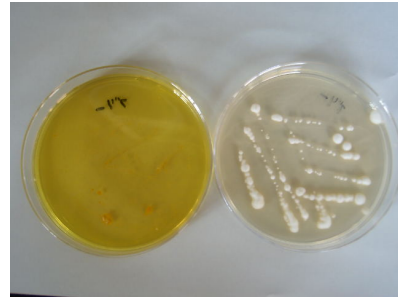


図3-2 ブリーチーズ

##### 3.2.4 糎

流通する時期がごく限られており、夏休み自由研究お助け隊では使用できなかった。冬に再実験を行った。糎は *Aspergillus.sp* を蒸し米に接種してあるため、きれいにカビのコロニーが観察できた。時間的に余裕があれば、ここからスライドカルチャーを作製して顕微鏡観察に続けたい。(図4)



図4

### 3.2.5 酒かす

清酒の製造工程で出てくる食品なので事前の予想がつかなかったが、好氣的なカビのほかに嫌氣的に酸を産生するバクテリア、酸を産生しないバクテリアなど各種のコロニーを観察できた。単離、染色、顕微鏡観察など観察の材料が多く期待される。(図5)



図5

### 3.2.6 キムチ

乳酸発酵が行われることが有名なので乳酸菌の生育を期待していたが、ごくわずか乳酸菌と思われるコロニーを観察することができた。(図6)

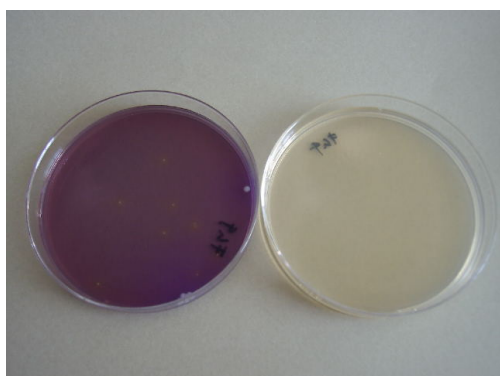


図6

## 4. まとめ

微生物を初めて扱う学生を対象とした実験のテンプレートとして、発酵食品から微生物を単離して観察する方法を取り上げ、使用する発酵食品、培地、培養方法を検討した。常温および冷蔵品として流通している発酵食品を選び、無菌的にプレートにストリークして好気培養と嫌気培養を行い、限られた時間でより観察がしやすい条件を検討したところ、常温で流通する食品についてコロニーは観察されず、冷蔵品については試料を生理食塩水で懸濁しただけの物より事前に液体培地で前培養を行うことでシャーレ上でのコロニーの生育が観察しやすいことが確認された。更に、培地を重層することで容易に嫌気

培養が可能になり、好気培養だけでは観察できない乳酸菌などを単離することができた。

今年度の「夏休み自由研究お助け隊 2005」で発酵食品について知りたいとの依頼があり、急遽準備をしたものの試料として使えるものについての予備実験などが追いつかないままで不消化に終わってしまった。現段階ではまだ不十分ではあるが、来年度はこの結果をもとに、自由度が高い中でもいろいろな方面に考察でき、より興味を持ってもらえるような実験を組み立てたいと考えている。その上で、学類の実験においてもより有意義なサポートができるよう検討していく必要があると考えている。

## 謝辞

今回の実験および資料作製、写真撮影にあたり、多大なご協力をいただきました生命環境科学等支援室応用生物化学系 古川理恵技術専門職員、山末亜貴技術専門職員、有本光江技術専門職員、和田睦子技術職員に感謝申し上げます。また、実験室の使用を快諾してくださいました生命環境科学等支援室生物学類中央室の路川宗夫技術専門職員に深謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] 応用生物化学実験Ⅱテキスト 筑波大学 生物学類 (2005)
- [2] 資源微生物学実験テキスト 筑波大学 生物資源学類 (2005)
- [3] バイオテクノロジー基礎実験テキスト 筑波大学 生物資源学類 (2005)