

乳清の静菌作用 Bacteriostasis of Whey

大川 真実 近藤 由菜 松井 陽美
Mami Ohkawa Yuna Kondo Hiromi Matsui

I. 研究目的

普段私たちがヨーグルトを食べるとき、ヨーグルトの容器の中の白い上澄み液、乳清を見ることがある。その乳清は、チーズ作るときにも固形物(おもにカゼイン)から分離して、副産物の液体として出され、大量に捨てられており、環境問題にも発展している。しかしこの乳清は、保湿性、抗酸化能、静菌作用、異物浄化作用とさまざまな性質を持っており、私たちはその作用のうちの静菌作用に注目し、乳清には本当に静菌作用があるのかの検証実験を行った。なお、静菌作用とは、菌の繁殖速度を抑えるもので、菌を殺す殺菌作用とは全くの別物である。

また、乳清の成分のうちの乳清タンパク質は、現在、静菌作用を及ぼす原因物質として考えられている。乳清タンパク質は、牛乳タンパク質のおよそ20%を占めていて、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリン、ラクトフェリンなどが含まれている。先行研究では静菌作用はラクトフェリンによるものと考えられていたが、それ以外にも静菌作用に関係するものがあるのではないかと考え、乳清の性質を調べ、静菌作用を及ぼす物質の探求を行った。

II. 研究方法, 結果, 考察

◎実験に用いた菌

実験に使用した菌は大腸菌(*Escherichia coli*)と黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)の2種類で、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源課から購入したものを使用した。それぞれの菌を斜面培地2本ずつに植え付け、培地が乾燥して菌が弱るのを防ぐため1ヶ月ごとに新しい斜面培地に植えつぎをした。

実験に使うときは、まず斜面培地から液体培地に菌を移し、大腸菌は1日以上、黄色ブドウ球菌は3~4日以上、振とう培養した。その後、実験に使用する平面培地に液体培地で培養した菌を塗布した。

◎検証方法について

乳清を入れたろ紙または穴の周りに阻止円ができていれば静菌作用あり、阻止円ができなければ静菌作用なしと判断する。阻止円の個数を数えてその個数をコントロールと比較し、検証実験を行った。

◎阻止円とは

阻止円というのは、抗生物質によって菌の生育が抑制されることによってできる菌が繁殖していない部分のことである。静菌作用がある場合、菌の生えた白い部分とは違い、試料を含んだろ紙、試料を入れた穴の周りには阻止円ができる。

◎実験材料

■乳清

実験に使う乳清は入手しやすいヨーグルトの乳清にした。

下の写真のように配置し冷蔵庫の中で24時間以上保存し、乳清をつくった。

ビーカーとドリッパー、漏斗は100°Cで10分間滅菌したものを使用した。



■ヨーグルト

乳清作りに用いたヨーグルトは次の2種類とした。

- ・明治プロビオヨーグルト LG21 (明治)
- ・明治ブルガリアヨーグルト LB81 プレーン (明治)

■培地

液体培地 (pH7.0)	ペプトン	10 g	} …① の割合で調合したものを使用した。
	乾燥酵母エキス	2 g	
	硫酸マグネシウム	1 g	
	蒸留水	1ℓ	

固体培地 (pH7.0)	①		
	寒天粉末	17 g	の割合で調合したものを使用した。

■実験器具

菌を培養するとき使用する道具、培地に穴をあけるとき使用する道具は、すべて新聞紙で包み、乾熱滅菌器を使って 180℃で 1 時間滅菌した。

ピペットとガラスの小さい筒(実験 2 以降の穴をあけるとき使用するものは、ピペットゴムから押し出した空気中のゴミが入らないように上部に綿を詰めてから滅菌した。

※ガラスの小さい筒は三好教頭先生が作って下さったものを使用した。

■実験 1 に用いるろ紙

実験 1 に用いた試料をしみこませるためのろ紙は、普通のろ紙を穴あけパンチで切り取った、直径 5.5～6 mm の円状のろ紙を滅菌し、使用した。

◎菌の撒き方

- ① 乾熱滅菌したスポイトで、菌を繁殖させた液体培地を 2～3 滴寒天培地に垂らす。
- ② スプレッダーをアルコールにくぐらせ、ガスバーナーであぶって滅菌する。
- ③ スプレッダーを一度寒天培地の端に付けて冷やしてから、①で垂らした液体培地で培養した菌を広げ、寒天培地の表面に広げる。

◎実験した場所

実験中無菌状態を保つためガスバーナーを用いて上昇気流を起こし、その下で実験をした。

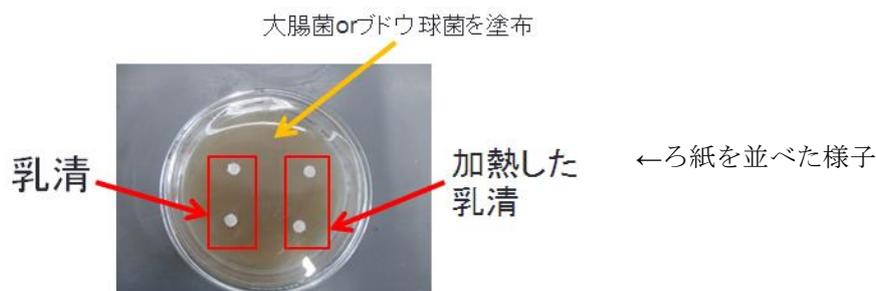
実験するときはアルコール消毒液で机を拭いたり、手に吹き付けたりと簡単な消毒をした。

(学校にあったクリーンベンチは、実験当初にクリーンベンチ内でガスバーナーを使うことができず、滅菌操作を行えなかったため使用しなかった。)

●実験 1

乳清は本当に静菌作用持っているのか確認するため、実験を行った。たんぱく質は熱に弱く、変性すると聞いたので、熱処理をした乳清と比べて未処理の乳清の静菌作用にはなにか違いがあるのかを調べることを目的とし、検証実験を行った。

- [実験] ①菌を撒いた寒天培地を用意する。(大腸菌 *E.coli* 2 枚, 黄色ブドウ球菌 *St.epi* 2 枚, 計 4 枚)
- ②2 種類の乳清を染み込ませたろ紙を 8 枚ずつ用意する。
- ・加熱した乳清 (沸騰させたお湯に 10 分間つける)
 - ・何もしていない乳清
- ③下の図のようにろ紙を配置する。

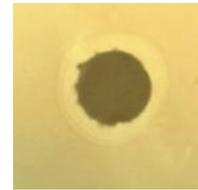


〔結果〕

静菌作用はほとんど見られなかった。



何もしていない乳清の1枚だけ
阻止円がうすく見られた。(大腸菌
E. coli)



〔考察〕 静菌作用が見られなかった原因として

- ・ろ紙がめくれており、上手く培地に付いていなかった。
 - ・乳清の量が少なかった。
- ということがあげられた。
⇒そのため、培地に穴をあけて実験する方法に変更した。

●実験 2

班の中で寒天培地に穴をあける方法の候補がいくつか出たため、その中で最適な方法を見つけることを目的として実験を行った。

〔実験〕寒天培地に穴をあける方法としてあがった候補は次の3つである。

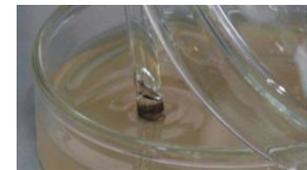
- ①金属の小さい筒をあける。
(刺して回して斜めに引き抜くことにより、培地を抜き出す。)
(黄色ブドウ球菌 *St.epi* 2枚) 大腸菌 *E.coli* 2枚,

①の様子



- ②熱したガラス棒で溶かす。
(6秒間ガスバーナーで熱した。)
(大腸菌 *E.coli* 2枚, 黄色ブドウ球菌 *St.epi* 2枚)

②の様子



- ③ガラスの小さい筒とスポイトゴムを用いて寒天培地を吸い取って穴を開ける。
(大腸菌 *E.coli* 3枚, 黄色ブドウ球菌 *St.epi* 3枚)

③の様子



〔結果〕

- ①3回に1回はきれいな穴をあけることができる。
しかしほとんどはきれいに穴ができない。
- ②溶かす際に寒天培地が勢いよく溶けて飛び散り、また、ガラス棒が割れたりするなどと、かなり危険だった。また、きれいな穴があかなかった。
- ③きれいな穴をあけることができた。
ほとんどの場合きれいに穴が開いた。

〔考察〕

③の方法が、最もきれいな穴をあけることができ、成功しやすい。
⇒よって、この実験以降は穴をあけるときは、③の方法を用いることにした。

●実験 3

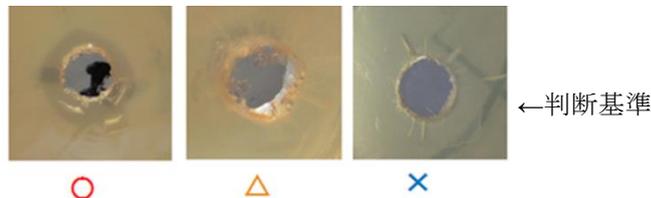
寒天培地に穴をあけて実験をし、乳清の静菌作用を確認することを目的とした。

〔実験〕①菌を撒いた寒天培地を用意する。

(大腸菌 *E.coli* 5枚, 黄色ブドウ球菌 *St.epi* 5枚, 計10枚)

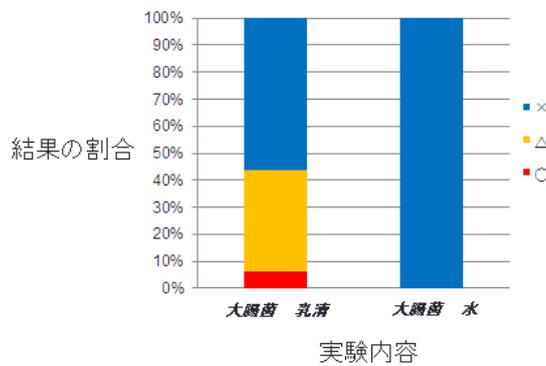
②寒天培地に 10 個穴を開け、それぞれ乳清を入れたもの 2 枚、またはオートクレーブ水(コントロール)を入れたもの 2 枚、何も入れないものを 1 枚用意し、菌の繁殖の様子を観察する。
 ※ここで、何も入れないものを 1 枚用意した理由は、何も入れない状態の菌の繁殖の様子をオートクレーブ水のものとは比べてみようと思ったから。

[結果]・乳清を入れた穴の半分ぐらいに阻止円が見られた。
 ・オートクレーブ水を入れた穴はすべてに阻止円が見られなかった。



シャーレの穴の周りに見られた変化を、○（静菌作用あり）、△（わずかな静菌作用あり）、×（静菌作用なし）に振り分けた。

実験 3(グラフ)



[考察]

- ・静菌作用を及ぼす物質の濃度が低いため、静菌作用の出た割合が低かったと考えた。
 ⇒このことから、乳清を濃縮して実験することにした。
- ・培地に穴をあけて実験する方法でわずかだが静菌作用が見られた。
 ⇒このことから、実験 4 以降でも培地に穴を開けて実験を行うことにした。

●実験 4

静菌作用を及ぼす物質の濃度を高めるため乳清を濃縮し、再び同じ実験をして静菌作用を確認することを目的とした。

[実験] ①菌を撒いた寒天培地を用意する。

(大腸菌 *E.coli* 5 枚, 黄色ブドウ球菌 *St.epi* 8 枚, 計 13 枚)

②寒天培地に 6 個穴を開け、濃縮した乳清, オートクレーブ水(コントロール)を穴の中に入れる。

③恒温器(26℃)で保存し、観察した。

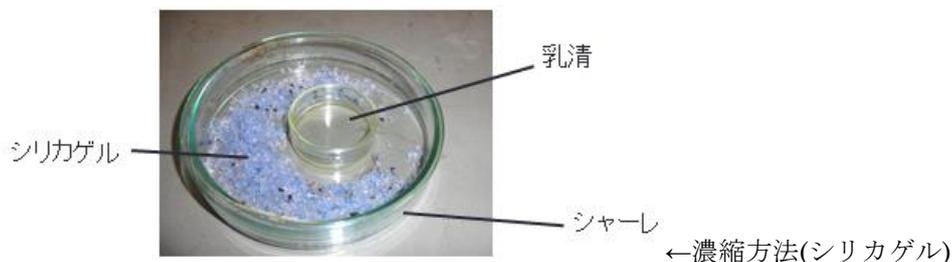
[濃縮方法について]

シリカゲル(乾燥剤)を用いて、乳清の水分を自然蒸発させることにより濃縮させた。

体積が約 1/4 になるまで濃縮した。

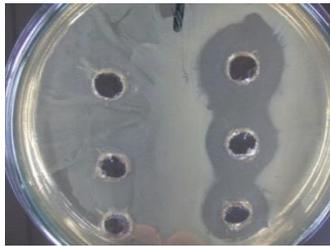
※濃縮するまでに一ヶ月以上かかった

※ほぼ毎日シリカゲルは入れ替えた

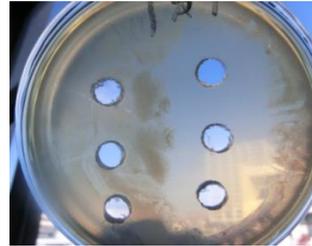


[結果]

乳清を入れた穴のすべてに、阻止円が見られた。



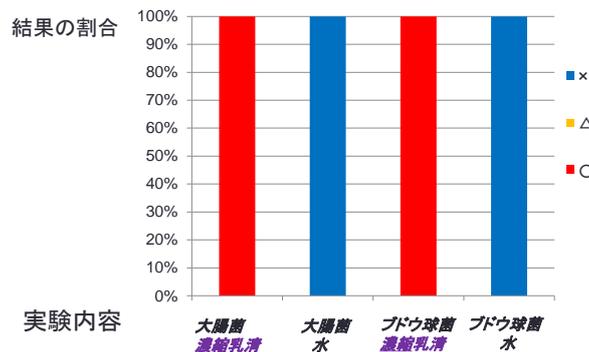
大腸菌 *E.coli*



黄色ブドウ球菌 *St.epi*

※どちらの写真も右側 3 つの穴に濃縮乳清，左側 3 つの穴に水を入れた。

実験 4(グラフ)



[考察]

- ・シリカゲルで濃縮した乳清には静菌作用がある。
- ・培地に穴を開ける方法でも実験が行えるとわかった。
- ⇒今後の実験はすべて培地に穴を開ける方法で行うことにした。
- ☆菌の発育の様子について
 - ・ブドウ球菌に雑菌が混じっている可能性がある。
 - ・ブドウ球菌の発育が遅い
- ⇒これらのことから大腸菌にしぼって実験することにした。

●実験 5

シリカゲルを用いた濃縮方法では乳清を濃縮するのに一ヶ月かかったため，その期間を短縮したいと思い，「タンパク質 I」（東京化学同人）と三好教頭先生の助言を参考にして，透析チューブを用いた濃縮方法で乳清の濃縮をして同じ実験を行った。

[実験] ①菌を撒いた寒天培地を用意する。(大腸菌 *E.coli* 18 枚)

②寒天培地に 6 個穴を開け，透析チューブを用いた方法で濃縮した乳清，オートクレーブ水(コントロール)を穴の中に入れる。

③恒温器(26℃)の中で保存し，観察した。

[濃縮方法について]

⇒透析チューブを用いて，体積が約 1/8 になるまで濃縮した。

(実験では，チューブの内液を使用する。)

水分を早く追い出すため，乳清を入れた透析チューブの周りに高分子のポリエチレングリコールを振りかけた。透析チューブは始めに 10 分間煮沸してから使用した。

濃縮した後，透析チューブを，マグネチックスターラーを用いて約 10 分間，周りについたポリエチレングリコールを洗い流した。



〔結果〕・静菌作用は見られなかった。

〔考察〕・透析チューブで濃縮したものでは、静菌作用は見られなかった。静菌作用を及ぼす物質は高分子ではなく低分子である可能性があり、今後の検証が必要だと考えた。

・今回使用した透析チューブの分画分子量は 10000～14000 で、乳清たんぱく質の中で静菌作用をもつと考えられているラクトフェリンは分子量が 86000 と透析チューブをとおり抜けにくい。よって実験 4 のシリカゲルで濃縮したもので見られた静菌作用はラクトフェリン以外ものが要因している。

●実験 6

オートクレーブ水、乳清、濃縮した乳清(シリカゲルを使用したもの)のあいだにある静菌作用の有無の有意差を、統計処理を用いて確かめることを目的とした。

〔実験〕①菌を撒いた寒天培地を用意する。(大腸菌 *E.coli* 18 枚)

②それぞれの寒天培地に 6 個ずつ穴を開ける。

乳清、濃縮した乳清、オートクレーブ水(コントロール)を穴の中に入れる。(各 3 枚ずつ)

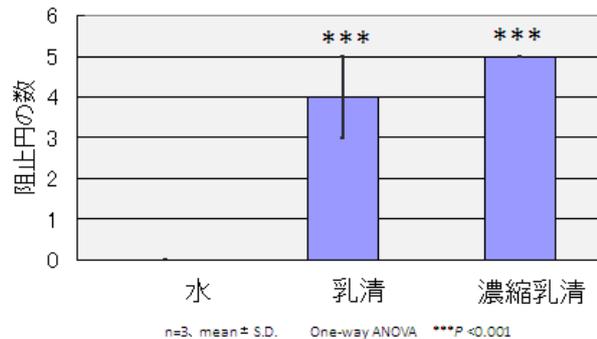
③見られた静菌作用の結果の統計処理をする。

(各実験区、穴が 6 個の寒天培地を 3 枚用意し、穴 6 個のうち阻止円ができた個数を記録した。そして水と乳清、濃縮乳清の阻止円の数と比較した。)

〔結果〕・オートクレーブ水と乳清、オートクレーブ水と濃縮乳清の静菌作用の間に有意差があった。

・乳清と濃縮乳清の静菌作用の間には有意差がなかった。

結果の統計処理をしたグラフ



〔考察〕・乳清と濃縮乳清の間に有意差が見られなかったのは濃縮乳清の濃縮期間が短かったためだと考えた。(全体の 4 分の 3 までしか濃縮されていなかった)

●実験 7

乳清の主な成分はたんぱく質であり、一般的にたんぱく質は熱に弱いと言われているので、熱処理をすることによって静菌作用に変化は出るのか、出るとしたらどれほどの温度で変化が出るのかを確かめることを目的として実験を行った。

〔実験〕①菌を撒いた寒天培地を用意する。(大腸菌 *E.coli* 35 枚)

②シリカゲルで濃縮した乳清を 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃のそれぞれの温度で熱処理をする。(恒温水槽で一定の温度に保った水にシリカゲルで濃縮した乳清を入れた試験管を 20 分間つける。)

③菌を撒いた培地に各 6 個ずつ穴をあける。

④それぞれの温度に熱処理をした乳清、コントロールとして熱処理をしていない濃縮乳清をいれる。(各 5 枚ずつ)

⑤恒温器(26℃)の中で保存し、菌の繁殖の様子を観察した。

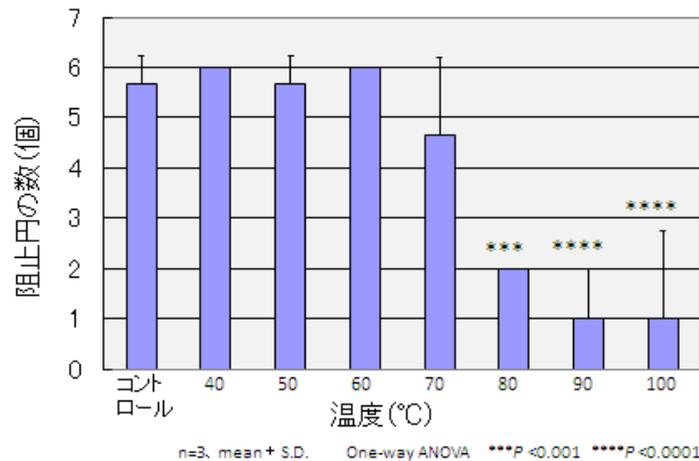
⑥その結果を統計処理する。

(各実験区、穴が 6 個の寒天培地を 5 枚用意し、穴 6 個のうち阻止円ができた個数を記録して、コントロールと比べ熱処理をした濃縮乳清の阻止円の数と比較した。)

〔結果〕・コントロールと 80℃、90℃、100℃で熱処理した濃縮乳清には有意差がある。

・コントロールと 40℃、50℃、60℃、70℃で熱処理をした濃縮乳清には有意差がなかった。

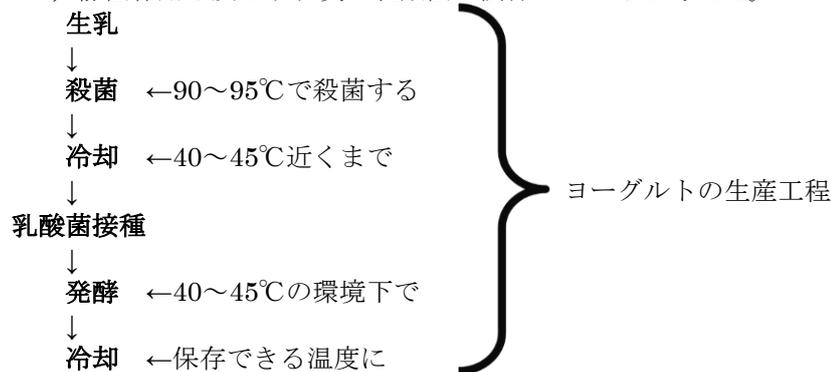
グラフ(熱処理実験)



[考察]・70℃と80℃の間で、阻止円の数が減っていることから、静菌作用を及ぼす物質は、70～80℃で失活するのではないかと考察した

・ヨーグルトを作る過程を含めて考えると、殺菌の過程で、通常90～95度で殺菌するので、70～80度で失活したことから、静菌作用を及ぼす物質はこの殺菌の過程以降にできた物質、および混入された物質であると考えられる。

⇒よって、静菌作用を及ぼす物質は乳酸菌が関係していると考えた。



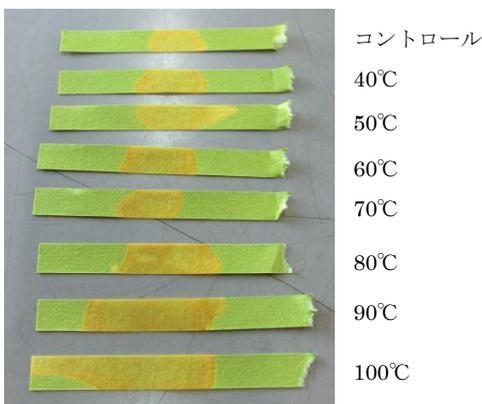
●実験 8

乳清は乳酸菌の生成する乳酸のため酸性になっていると考えられるので、そのことも菌が繁殖しなかったことに関係しているのではないかと考え、実験8に用いた乳清のpHを測定し、大腸菌の繁殖限界のpHと比較し菌が酸によって増殖が抑制されたのか、静菌作用によって抑制されたのかを検証することを目的とした。

[実験] 実験7に用いた乳清(8種類)のpHを、pH試験紙を用いて測定した。

[結果] どの温度の場合もpHが約4.0だった。

乳清を垂らした pH 試験紙の様子



使用した pH 試験紙



[考察]・大腸菌の酸性生育限界値は pH4.5 のため、乳清が酸性であることも菌の繁殖を抑制した要因のひとつであると考えられる。

Ⅲ. 結論

- ・乳清には静菌作用がある。
- ・シリカゲルを用いて濃縮した乳清でも、静菌作用がある。
- ・静菌作用を及ぼす物質は、長時間の乾燥に耐えられるものである。
- ・静菌作用を及ぼす物質は低分子である可能性がある。
- ・静菌作用を及ぼす物質は、70～80℃で失活する。
- ・静菌作用を及ぼす物質は、乳酸菌が関係している。
- ・乳清が酸性であることも菌の繁殖を抑制した要因のひとつである。

これらのことから、乳清の静菌作用は、乳清の中に含まれる上記のような性質を持つ様々な物質の相互作用により及ぼされるものである。

Ⅳ. 謝辞

今回の研究に際して、テーマ選びから実験の基本となる培地の作り方や菌の培養の仕方、実験環境の整え方などまで丁寧にご指導してくださった三好教頭先生、研究を終始温かく見守ってくださり、グラフ作成や統計処理において多くのアドバイスを下さりました、松本澄洋先生に厚くお礼申し上げます。誠にありがとうございました。

Ⅴ. 参考文献

乳製品製造学(農学博士・伊藤 肇躬)
牛乳・乳製品の知識 (野口洋介)
ヨーグルトの科学 ~乳酸菌の贈り物~(細野明義)
タンパク質 I (東京化学同人)