

REHSE「高校生による環境安全とリスクに関する自主研究活動支援事業」

平成29年度 研究活動報告書

1 背景と目的

沖縄県では、県の特産品である島豆腐の製造過程で年間約5000トンものおからが産業廃棄物として排出されている。また、それを処理するための経費によって島豆腐製造企業に大きな負担がかかり、それが県内の島豆腐製造企業の減少の一因ともなっている。そこで本研究では、おからの有効利用方法を検討することで島豆腐由来産業廃棄物の削減を図り、島豆腐製造企業の存続と島豆腐伝統の未来への継承を目指して実験を行った。

2 概要

高齢化社会になりつつある日本では、筋力低下から転倒し、骨折などによって一時的に寝たきりの生活になる高齢者が増加している。寝たきりの生活から通常の生活に戻るのには容易ではなく、リハビリが必要で、多くの時間と体力を消耗するものである。

そこで私たちは、おからを乳酸菌発酵することによって筋肉増強に効果があるとされるバリン・ロイシン・イソロイシンを生成させ、高齢者の転倒等予防やリハビリを手助けするようなサプリメントの開発を行いたいと考えた。今回は、おからから複数の乳酸菌を単離し、その中からバリン・ロイシン・イソロイシンを多く生成する乳酸菌3株を見つけた。

研究項目		時期
おからの産業廃棄物について調べる	県立図書館にて島豆腐の歴史や製造方法を調査	平成29年8月31日
	南城市にある島豆腐製造業者なかむら食品さんにて、島豆腐製造方法の見学、現状調査、問題解決に向けての意見交換	平成29年9月22日
第1回実験	おからや豆腐、豆乳を乳酸菌で発酵、単離	平成29年9月下旬～10月上旬
	DNA塩基配列分析により、乳酸菌18株の同定	平成29年10月上旬～11月下旬
成果発表	ConBio2017 高校生研究発表にて、口頭発表とポスター発表	平成29年12月9日
第2回実験	おからを乳酸菌で発酵、単離	平成29年11月下旬～12月上旬
	実験2で単離した乳酸菌76株、実験1で単離した乳酸菌18株、比較対象として6株の乳酸菌を加えてアミノ酸分析	平成29年12月下旬
	乳酸菌1個体あたりのアミノ酸生成量を調べた	平成29年12月下旬～平成30年1月上旬
	アミノ酸生成量の高い乳酸菌3株を選抜し、DNAシークエンスにより同定	平成29年12月下旬～平成30年1月上旬
	選抜した乳酸菌をおからで発酵させ、アミノ酸分析	平成29年12月下旬～平成30年1月上旬

3 活動内容

3.1 見学

- ① 日時：平成 29 年 9 月 22 日（金）
場所：株式会社 なかむら食品
見学の目的：島豆腐の製造方法や廃棄物を間近で見ることによって、島豆腐の歴史、現状や問題点を学ぶ。
- ② 日時：平成 29 年 12 月 20 日（水）
場所：沖縄科学技術大学院大学（OIST）
見学の目的：アミノ酸の分析実験を行わせていただくとともに、研究現場や最新の実験施設の見学を行った。

3.2 研究成果の発表

平成 29 年 12 月 9 日（土）
発表の場：ConBio2017〈2017 年度生命科学系学会合同年次大会〉
発表題目：「島豆腐の副産物「おから」の有効利用について」
発表形態：口頭発表、ポスター発表
発表者名：＜口頭発表＞川満日向子、＜ポスター発表＞新垣さくら、新垣奈留瀬

3.3 その他の活動

- ① 日時：平成 30 年 1 月 21 日（日）11 時 00 分～17 時 00 分
場所：沖縄県宜野座村文化センターがらまんホール
発表の場：ヤンバルの食と文化
活動内容：年齢問わず少しでも多くの人に島豆腐について知ってもらうために、地域で開催されたイベントである「ヤンバルの食と文化」において島豆腐産業の現状についてポスター発表を行った。
発表題名：「島豆腐を未来へー島豆腐と乳酸菌のマリアージュー」
- ② 日付：平成 29 年 8 月 31 日（木）
場所：沖縄県立図書館
内容：島豆腐の歴史、製造方法についての調査を行った。

4 実験

4.1 【第 1 回】手順

- (1) おからから乳酸菌を単離
株式会社なかむら食品から入手したおから 2 種類・豆腐・豆乳の計 7 サンプルを 2 か所に設置し、48 時間放置した。その後、回収し MRS 寒天培地に原液と 10 倍希釈したものを塗布した。2 日後、コロニーの選別を行い、MRS 液体培地に単離した。計 18 株単離することができた。
- (2) 単離した乳酸菌 18 株の同定
培養した菌から DNA 抽出を行い、同 DNA を PCR にかけてその産物を凝縮し濃度を上げ電気泳動を行った。この際バンドが出なかったため、プライマーを変えて再度 PCR・電気泳動を行った。
PCR 産物を生成し、Qubit で濃度を測定した後、一定の濃度に希釈した。
ダイターミネーター法を行い、キャピラリーシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。プライマー F1,R1 と F2,R2 を使用する予定だったが、今回はシーケンスに使用する試薬が足りず F1,R1 のみシーケンスを行った。

4.2 【第 1 回】結果

(1) おからから乳酸菌を単離

図1のようにMRS寒天培地で乳酸菌を培養し、単離を行った。

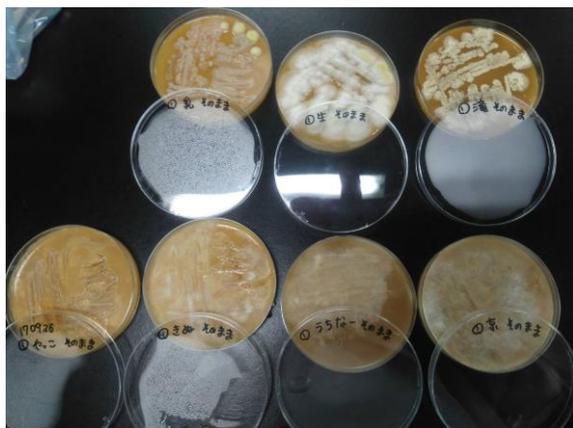


図1：MRS寒天培地で培養した様子

(2) 単離した乳酸菌18株の同定

同定した結果、表1のような乳酸菌であることが分かった。

表1：選抜した18株の同定結果

サンプル名	bp(F2)	bp(R2)	属	相同性(%)
F2R2-1	968	705	—	—
F2R2-2	—	758	—	—
F2R2-3	614	722	<i>Enterococcus faecalis</i>	85
F2R2-4	730	707	—	—
F2R2-5	623	674	—	—
F2R2-6	661	—	<i>Enterococcus sp</i>	93
F2R2-7	612	—	—	—
F2R2-8	983	—	—	—
F2R2-9	634	695	<i>Lactobacillus plantarum</i>	96
F2R2-10	201	679	—	—
F2R2-11	693	617	<i>Enterococcus faecalis</i>	98
F2R2-12	717	690	—	—
F2R2-13	533	679	—	—
F2R2-14	723	212	—	—
F2R2-15	630	631	<i>Enterococcus faecalis</i>	95
F2R2-16	—	376	—	—
F2R2-17	546	—	<i>Lactococcus garvieae</i>	99
F2R2-18	497	—	<i>Enterococcus hirae</i>	93

※—は検出された塩基配列のクオリティーが低かったため同定ができなかった。

4.3 【第2回】実験手順

第1回の実験でおからから取れる乳酸菌の株数が少なかったため、再度おからのみから乳酸菌を単離した。

(1) おからから菌を単離

第1回の実験手順と異なり、おから10gのみを5つ、おから10gと水5ml（おからが浸る程度）を2つの計7つのシャーレを1か所（沖縄高専内の温室）に設置し48時間放置した。その後、第1回の実験手順と同様、培養、コロニーの選別、単離を行った。計81株の細菌を単離することができた。

(2) 培養液あたりのアミノ酸生成量を分析（MRS培地で培養後）

第2回の実験で単離した81株、第1回の実験で単離した18株、ポジティブコントロール1株合わせて100株の乳酸菌の培養液をOIST（沖縄科学技術大学院大学）に持っていき、バリン、ロイシン、イソロイシンのアミノ酸生成量を分析した。分析する前の準備として、培養液の濁度測定を行い、菌数を揃えた。

brank	19.1	4.5	40.4	51	30	8.5	40.9
1	80.3	27.5	106.7	52	76.9	5.7	35
2	82.9	26.5	94.8	53	19.2	4.2	30.6
3	80.2	17	104.3	54	47.7	7	38.4
4	74.3	18.3	104.6	55	46.7	13	66.1
5	66.1	22.3	91.1	56	14.4	4	19.5
6	62	14.7	73.5	57	118.6	38.3	173.5
7	76.7	19.2	107.9	58	13.8	3.6	18.9
8	73.6	19.7	94.8	59	26.1	6.3	38.4
9	56.5	12.1	78.7	60	18.7	4.7	30.8
10	72.6	16.4	96.8	61	20.4	4.5	30.4
11	67.8	15	94.8	62	15.6	4.2	22.2
12	50.4	16.2	56	63	13.9	4	20.3
13	62.6	13.7	85.7	64	15.9	5	27
14	58.5	13.8	84.2	65	30.5	8.6	44.8
15	105.5	29.4	135.7	66	16.4	5	26.7
16	55.3	13.8	65.6	67	16.8	4.3	28.2
17	54	12.2	75.7	68	13.5	3.5	19.1
18	55.7	13.2	80.5	69	14.5	3.4	22.7
19	63.3	14.7	96.3	70	22.4	5	35.2
20	41.6	11.5	55.9	71	14.8	3.1	24.6
21	48.1	13.7	69.3	72	12.6	3.2	15.1
22	42.4	9.2	61.4	73	13	3.1	23.6
23	39.2	10.7	52.1	74	12.3	2.8	17
24	45.4	10.9	67.8	75	18.1	4.2	33.6
25	38.4	9.4	53.7	76	12.2	3.9	18
26	34	8.3	52.8	77	13.9	3.5	21.5
27	30.3	9.3	43.8	78	14.6	3.8	25
28	37.4	10.3	48.9	79	14.9	4	27
29	31.1	10.2	48.6	80	10.4	2.6	17.8
30	27.4	6.2	38.4	81	7.5	2.2	16.1
31	32.6	9.5	52.5	82	16.1	2.2	9.7
32	37.6	9.1	62.5	83	7.7	2.8	11.2
33	31.7	7.8	52.5	84	31.4	N.D.	16.3
34	35.2	8	56.2	85	65.8	4.3	37
35	17.8	5.6	25.8	86	46.2	3.1	28.7
36	29	8	41.7	87	28.8	1.8	14.8
37	32	7.5	46.7	88	24.9	1.7	13
38	22.8	6.5	33.2	89	24	1.6	13.1
39	30.7	8	55.6	90	26.5	2.1	14.5
40	148.5	35.1	268.4	91	44.8	3.3	26.3
41	19.8	5.7	28.5	92	5.7	2.2	7.5
42	26.1	7.3	37.4	93	7.5	2.8	11.1

43	24.7	5.8	39.6	94	5.4	2.2	7.4
44	20.5	5.5	31.4	95	7.5	2.8	10.8
45	35	7.3	50.6	96	32.2	2.3	18.9
46	28	5.5	43.4	97	7.2	2.8	10.2
47	26.2	6.2	41.4	98	9	2.8	13
48	30.3	8.7	43.6	99	7.8	1.8	9.3
49	22.4	6	30.7	100	31.8	2.1	18.7
50	17.7	4	29.2				

※サンプル番号 1～81 : 第2回の実験で単離した菌 81 株

サンプル番号 82 : ポジティブコントロールとして、アミノ酸を生成すると知られている乳酸菌

サンプル番号 83～100 : 第1回の実験で単離した菌 18 株

アミノ酸生成量上位 3 株は以下のようになった。

1、sample 40 2、sample 57 3、sample 15

(3) 乳酸菌 1 個体あたりのアミノ酸生成量

表 3 は、アミノ酸生成量上位 7 株、中位 5 株、下位 5 株の 1 個体あたりのアミノ酸生成量を求めた結果である。

表 3 : 乳酸菌 1 個体あたりのアミノ酸生成量

sample#	Valine(μmol)	Isoleucine(μmol)	Leucine(μmol)
上位			
40	1.56E-07	3.69E-08	2.83E-07
57	1.85E-08	5.95E-09	2.71E-08
15	1.32E-07	3.68E-08	1.7E-07
1	7.44E-09	2.55E-09	9.88E-09
2	2.07E-08	6.63E-09	2.37E-08
7	5.88E-08	1.48E-08	8.3E-08
3	1.71E-08	3.62E-09	2.22E-08
中位			
46	4E-08	7.86E-09	6.2E-08
91	9.53E-09	7.02E-10	5.6E-09
47	7.49E-08	1.77E-08	1.18E-07
30	8.06E-09	1.82E-09	1.13E-08
42	5.22E-08	1.46E-08	7.48E-08
下位			
95	1.76E-10	6.59E-11	2.54E-10
97	5.95E-10	2.31E-10	8.43E-10
99	3.55E-09	8.18E-10	4.23E-09
92	2.71E-09	1.05E-09	3.57E-09
94	5.84E-10	2.38E-10	8E-10
比較の乳酸菌 (LC-Ikematsu 株)			

82	1.93E-07	4.29E-08	1.95E-07
----	----------	----------	----------

表3から sample40、sample57、sample15 は生菌数を踏まえて考えても、アミノ酸生成量が多いということがわかった。

(4) アミノ酸生成量上位3株の同定

アミノ酸生成量上位3株 sample 40、sample 57、sample 15 の同定を行ったところ、以下のような結果となった。

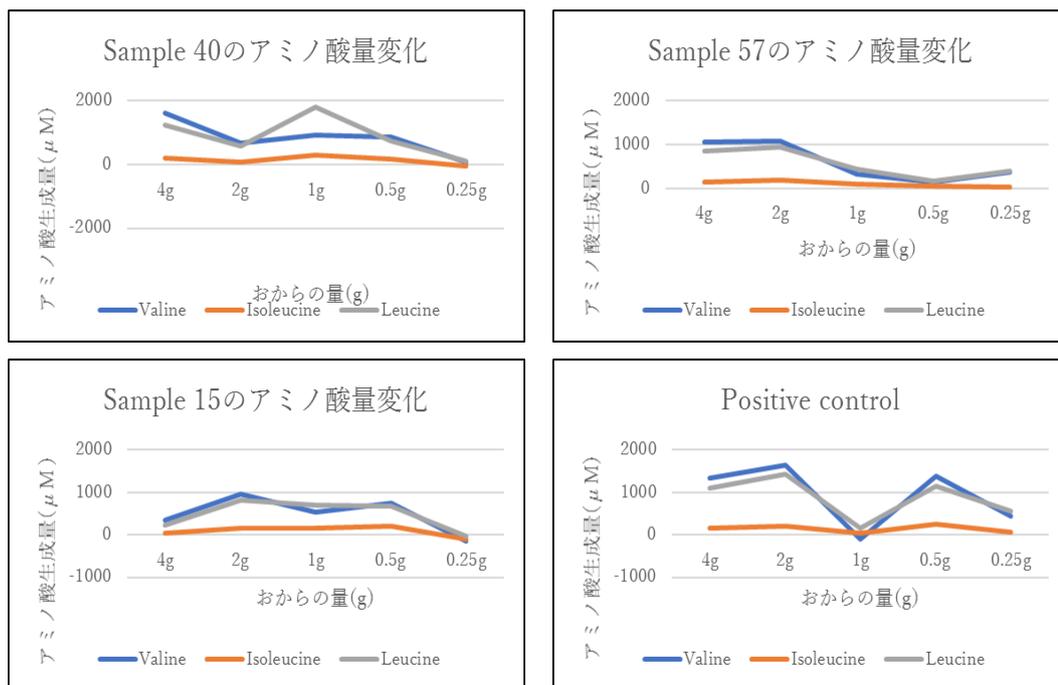
サンプル名	株	属	相同性 (%)
40	1542	<i>Lactococcus</i>	99
57	803	<i>Lactococcus</i>	98
15	1478	<i>Lactococcus</i>	99

(5) バリン、ロイシン、イソロイシンのアミノ酸生成量を分析（おからで培養後）

表2の100株のアミノ酸生成量分析（MRS培地で培養後）の上位3株をおからで培養後、アミノ酸生成量を分析した。結果は、表のようになった。

表：バリン、ロイシン、イソロイシンのアミノ酸生成量分析（おからで培養後）

sample#	おからの量 (g)	Valine(μmol)	Isoleucine(μmol)	Leucine(μmol)
Blank	4	259	77	487
	2	184	83	261
	1	1094	187	832
	0.5	335	63	323
	0.25	430	178	356
40	4	1872	277	1729
	2	859	177	833
	1	2035	493	2650
	0.5	1191	250	1055
	0.25	502	122	484
57	4	1317	220	1344
	2	1274	277	1216
	1	1431	284	1286
	0.5	490	122	501
	0.25	812	207	745
15	4	600	123	723
	2	1138	239	1080
	1	1639	344	1537
	0.5	1090	260	991
	0.25	274	87	316
82 (LC-Ike matsu 株)	4	1601	230	1587
	2	1835	292	1684
	1	985	219	992
	0.5	1729	327	1475
	0.25	884	236	907



グラフ：上位3株におけるおからの量を変化させたときのアミノ酸生成量の変化
 Sample 82のポジティブコントロール以外はおからの量が1gの時に最もアミノ酸生成量が多いことがわかった。Sample 82は2gの時に最もアミノ酸生成量が多い。

4.5 考察

第2回の実験の(5)バリン、ロイシン、イソロイシンのアミノ酸生成量を分析（おからで培養後）でおからの量1gの時に最もアミノ酸の生成量が多かった。このことから、水10mlと1gのおからの比率で乳酸菌は最もアミノ酸生成効率が良いと考えた。

ブランクには水とおから、何も培養させていないMRS液体培地のみ入れた。MRS液体培地にもアミノ酸は含まれているが、MRS液体培地は等量入れたため、おからのみがおからの量の変化の原因であると考えられる。しかし、同様に1gの時にアミノ酸生成量が多かった。このことから、ブランクがコンタミネーションしていたと考えられるため、再度実験が必要である。

また、今回の実験では、おからの量が増えるにつれてアミノ酸の生成量がどのように変化するかを調査するための実験であったが、おからのみの分量を変えてしまったため、水とおからの比率が均一でなくなってしまった。このため、乳酸菌にとってアミノ酸を生成させる最もよい環境を調査する実験となっていた。

今回の実験で、乳酸菌にとって最もよい環境を知ることができたため、次の実験では水とおからの比率が均一になるように実験を行いたい。

今回の実験ではバリン、ロイシン、イソロイシンに注目しておからから単離した菌を選抜した。しかし、選抜外のおからの中には、他の良い性質を持った菌が存在している可能性がある。今後、バリン、ロイシン、イソロイシン以外のアミノ酸にも注目して他の菌も分析していきたい。

5 「環境安全とリスク」に関する意見と感想

今回のテーマである「おから」以外にも、県内外さらには国内外問わず毎日多くの産業廃棄物が排出されている。廃棄物の処理場所や処理方法が議論されている中で、今回の研究を通して私たちは、ゴミをゴミとせず、その地域の中で循環させることはできないだろうかと考えた。授業で学んだ、「炭素や水の循環」のように人が生活の中で排出したものを人の生活の中で循環させることができれば、世界で問題になっている環境問題の一部だけでも解決につながるかもしれない。例えば、

今回テーマとした沖縄県の産業廃棄物であるおからの場合、大豆から豆腐を作り、その副産物として排出されるおからを、微生物の力で新しい物質に変えることや、その他にも県内で飼育されている家畜の飼料とすることも可能であると考えた。今回の研究を通して、産業廃棄物として処理されているものでも、考えてみると様々な可能性があることを実感した。また、「処理方法が問題になる」と聞くと一番に浮かぶのは放射性廃棄物である。現在は埋め立てたり、一か所に集めたり、“不要なもの・邪魔なもの”というイメージが強い。処理方法が問題になっていて、かつその問題が解決していないにも関わらず、原子力発電が人間の生活に必要とされている状況にも変わりはない。その中で私たちに一番求められているのは、新しい機械を作って問題を解決しようとするより、生活している一人一人が問題に関心をもつことなのではないだろうか。

沖縄を初めとして多くの地域で「ゴミをゴミとして終わらせない」、リユース・リデュース・リサイクルの輪を今より広げていくことができれば、もっと便利かつ豊かな世の中になるのではないかと感じた。そのためにも、本実験を通して感じたこの気持ちを行動に変え、率先して廃棄物の削減に努めていきたい。

6 今後の課題

DNA塩基配列分析を行ったことで、最もアミノ酸生成量の多い菌の同定ができた。今後、この菌の生態について詳しく調べ、おからを発酵させる際にどのような環境下であれば最も力を発揮するのかを調べていきたい。また、第2回の実験の(5) バリン、ロイシン、イソロイシンのアミノ酸生成量を分析（おからで培養後）でコンタミネーションしてしまったため、再実験を行う必要がある。

今後の展望としては、実際に商品化することを視野に入れ、今回決定した乳酸菌がどのくらい安定してアミノ酸を生成するのかを確かめたい。そのために、発酵条件を様々に変えた中でアミノ酸の生成量がどれほど変化するのかなどを調べ、分析した値の有意差検定なども行っていきたい。

7 まとめ

本研究の一番の成果は、有用なアミノ酸を高濃度で生産する乳酸菌を単離できたことである。この乳酸菌を同定すると *Lactococcus lactis*、*Lactococcus galvieae*、*Lactococcus galvieae*、であることがわかった。また、この乳酸菌は1個体あたりのアミノ酸生成量も高く、おからと水のアミノ酸生成効率の良い比率も予測を立てることができたので、今後商品化に向けてさらに研究を進めていきたい。