

高菌数、高生残性ビフィズス菌含有 ヨーグルト製造方法の技術開発



①

②

③

④

森永乳業株式会社 清水(肖)金忠①

森永乳業株式会社 宮地一裕②

森永乳業株式会社 小田巻俊孝③

森永乳業株式会社 米澤寿美子④

はじめに

近年の研究から腸内細菌は肥満や糖尿病、アレルギー疾患、潰瘍性大腸炎、大腸ガン、さらには自閉症など様々な疾病との関連が示唆されている。Bifidobacterium属細菌(以下ビフィズス菌)は、ヒト腸管細菌叢の主要構成菌であり、酢酸や乳酸を産生することで悪玉菌の増殖を抑制する他、様々な生理機能が報告されている。

森永乳業(株)では母乳栄養児の腸内にビフィズス菌が優勢に棲んでいることに着目し、1960年代からビフィズス菌に関する研究を開始した。1969年に健康な乳児からBifidobacterium longum BB536株(以下BB536)を分離し、1971年にはビフィズス菌を含有するヨーグルトの開発に成功した。40年以上に渡る基礎・機能性・応用研究から、BB536は腸内環境改善作用を基本とする多くの生理機能を有していることが明らかになっている。現在、BB536は国内のみならず、世界中の多くの国においてもサプリメントや育児用粉乳などに利用されており、2007年には米国FDAからGRAS(Generally Recognized As Safe)認定を受けている。

ビフィズス菌などのプロバイオティクスによる生理作用を期待するには、ある程度の生きた菌数を摂取することが好ましい。しかし、本来は腸管に棲む偏性嫌気性菌であるビフィズス菌、特にヒトの腸管に多く棲息するB. longumなどの菌種を牛乳中で増殖させ、長く生存させるには困難を伴う。その理由として、①牛乳にはビフィズス菌の生育にとって必要な遊離アミノ酸やビタミンなどの栄養素が不足していること、②製造工程において酸素が混入してしまうこと、③発酵乳製造に一般的に用いられるいわゆるヨーグルトスターター乳酸菌であるStrepto-

coccus thermophilusやLactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus等が産生する乳酸や過酸化水素によりビフィズス菌の増殖及び生残が妨げられること、等が挙げられる。そのため、これまでには酵母エキス等のビフィズス菌増殖促進物質の添加や、酸及び酸素耐性を有するビフィズス菌株の選抜、酸素透過性の低い容器の使用、ビフィズス菌の増殖及び生残に影響の少ない乳酸菌株の使用など様々な工夫がなされていた。しかし、これら工夫には追加コストが必要な上に、最終製品の風味に悪影響を及ぼす可能性も考えられる。また、フルーツを含有するヨーグルトやドリンクタイプヨーグルトは、酸や酸素の影響をより強く受けるため、利用をプレーンタイプヨーグルト等に限定せざるを得ない状況にあった。

本演題では、これらの課題を解決するに至った、高菌数・高生残性ビフィズス菌BB536含有ヨーグルトの製造方法の開発およびその作用機序解析など、森永乳業(株)で取り組んだ内容を紹介する。

1. 発酵乳中におけるビフィズス菌の増殖および生残性を改善する乳酸菌の探索

筆者らは先述の課題解決に向けて、まずBB536を対象に増殖促進作用を示す乳酸菌について幅広く探索したところ、一部のLactococcus(L.)lactis菌株との混合発酵により、乳培地におけるBB536の増殖が著しく促進されることを見いだした。その効果はBB536以外のビフィズス菌種に対しても見られ、幅広い有用性が示された(図1A)。BB536に対しては、非添加時と比較し1000倍以上もの増殖作用を示すL.lactis菌株も存在した。さらに一部のL.lactis菌株と混合発酵した際には、さらに冷蔵保存中におけるビフィズス菌の生残性についても大

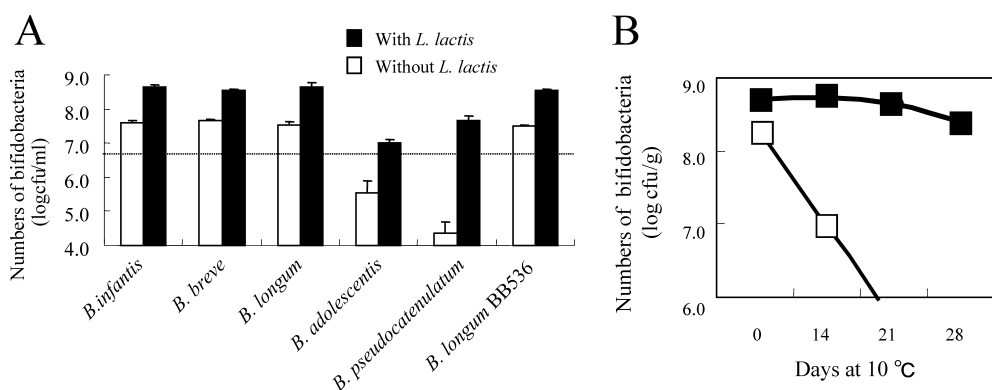


図1 *Lactococcus lactis* とビフィズス菌の共発酵によるビフィズス菌の増殖(A)および保存生残性(B)に対する改善作用
□: *L. lactis* を含まない発酵方法; ■: *L. lactis* との組み合わせによる発酵方法。(A)で株名の標記のないものはすべてタイプストレインを用いた。

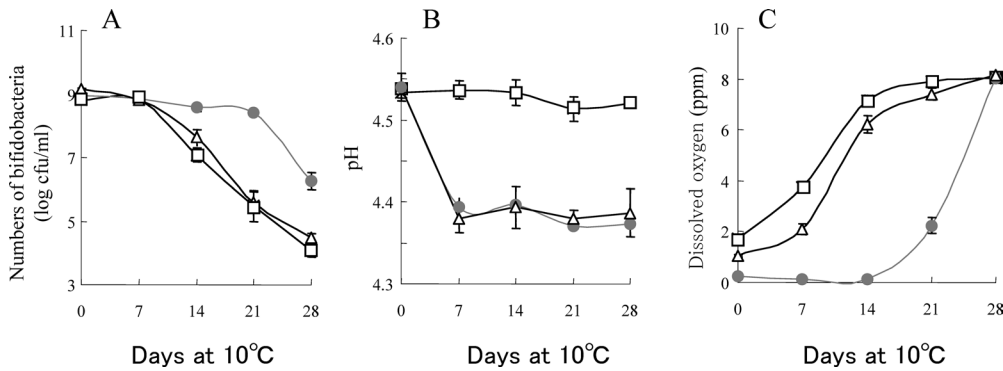


図2 冷蔵保存中における発酵乳の(A) ビフィズス菌数, (B) pH および (C) 溶存酸素濃度
 □: *B. longum* BB536 の単独培養, △: *B. longum* BB536 と保存生残性改善作用の無い *L. lactis* 株との共培養, ●: *B. longum* BB536 と保存生残性改善作用を有する *L. lactis* 株との共培養.

幅に改善されることを見出した(図1B).

2. *L. Lactis* との混合発酵による製品開発

ところが, この作用は *L. lactis* 菌株と BB536 の2種混合系では問題なく再現できたものの, 実際ヨーグルトを製造するためにヨーグルトスターター乳酸菌と共に複数菌種で混合発酵した場合には, 発酵がうまく進まない問題が生じた. そこで, ヨーグルトスターターと相性のよい *L. Lactis* 菌株の選定や混合比率等の検討を繰返し, 最終的に複数菌種での混合発酵ヨーグルトの製品化に成功した. その際, より良い *L. lactis* 菌株を取得するために *Lactococcus* 属細菌7種を同時に検出できる新規 Multiplex-PCR法の考案と, *L. lactis* 菌種と菌株を同時に識別可能な *L. lactis* 特異的 rep-PCR法を開発し, 自然界から菌株の分離・収集を行い, 豊富な菌株蓄積に至った. これらの研究により開発された技術によって, 様々な発酵乳製品における十分なビフィズス菌数の維持が可能となり, 酸度の高いフルーツタイプや, 溶存酸素濃度が高くなりやすいドリンクタイプのヨーグルト中でも, BB536 の保存生残性が安定した製品の開発に成功した.

3. *L. lactis* によるビフィズス菌の増殖促進機序

これまでも一部のビフィズス菌種 (*B. breve*, *B. animalis* など) に限定して増殖および生残性を改善する作用のある *L. lactis* 菌株の使用に関する技術が開発されていたが, *B. longum* など他のビフィズス菌に対して汎用的な技術ではなく, その作用機序も解明されていなかった.

ビフィズス菌は, 発酵乳ベース中で乳糖を利用し炭素源を確保できるが, タンパク質分解酵素をもっていないことから自ら十分な窒素源を確保することができない. 本研究で得られたビ

フィズス菌増殖作用を示す *L. lactis* 菌株は, 細胞壁結合性タンパク質分解酵素 (PrtP) を保有しており, この酵素により産生されたペプチドやアミノ酸を混合発酵中にビフィズス菌が効率良く利用し, その増殖が促進されていることがわかった(図3). この活性物質の特定を試みたところ, ビフィズス菌を増殖させる物質は, *L. lactis* 菌株により異なることが示唆された.

また, 発酵中の溶存酸素濃度を測定したところ, *L. lactis* との共培養では溶存酸素が著しく減少していたことから, 酸化還元電位の低下もビフィズス菌の増殖促進に寄与していると考えられた.

4. *L. lactis* によるビフィズス菌の冷蔵保存時における生残性改善作用機序

発酵乳に含まれるビフィズス菌は, 冷蔵保存中に環境中の様々なストレスにさらされる. 特に生残性に影響を与える因子と考えられる保存中の pH と溶存酸素の挙動について計測をしたところ, pH値は差が認められなかったが, 保存期間中の溶存酸素については, 改善作用のある *L. lactis* 株では低い濃度で維持されていた(図2). 以上より, ビフィズス菌の生残性改善作用は, 酸よりも酸素によるストレスを緩和することが重要であると考えられた. *B. longum* および *L. lactis* は共にカタラーゼを有していないため, NADH オキシダーゼをはじめとする特徴的なフラボタンパク質により酸素消費を行うことが知られている. そこで, *L. lactis* における遺伝子発現の比較解析を行ったところ, その一つである2成分性NADH ペルオキシダーゼの構成成分であるアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ (*ahpF*, *ahpC*) が, 保存2週間後において改善作用のある株での遺伝子発現量が改善作用のない株よりも有意に高い値を示

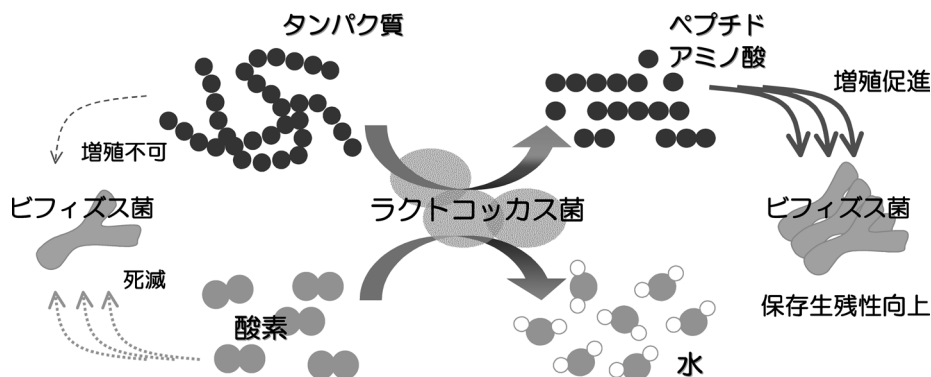


図3 *Lactococcus lactis* によるビフィズス菌増殖促進作用, および冷蔵保存中のビフィズス菌生残性改善作用のメカニズム

したため、この活性がヨーグルト中の酸素除去に重要な役割を担っていると推測された(図3)。

さらに、保存生残性に効果のある *L. lactis* 菌株では、保存期間中を通じて2価鉄イオン輸送システム (*feoB*) の発現が高く維持されており、ヨーグルト中の遊離鉄濃度も減少していたことから、フェントン反応が抑えられ、結果としてBB536はヒドロキシラジカルによる酸化も受けにくくなっている可能性が考えられた。

おわりに

ヨーグルトに代表される発酵乳製品は私たちの身近な食品であり、特定保健用食品として効果効能を謳った製品も多く発売されている。ヨーグルト中のビフィズス菌数を維持させるこれ

までの工夫は、風味やコスト、製品タイプの制限と多くの課題が残されていた。これら課題を解決し開発された製品群「森永ビヒダスシリーズ」は2008年より販売を開始し、現在は常時10種類以上の製品ラインナップを展開している。本技術を活用し、よりおいしい製品の開発を続けていくことで、人々の健康へ役立つ製品を今後も広く提供していきたい。

謝 辞 本研究開発は森永乳業(株)における基礎研究、製品開発およびマーケティングなどの関連部門との協働により達成された成果であります。携わっていただいた関係者の皆様に深謝申し上げます。