

## 市販発酵乳およびそれをスターターとして試作した食品中の高分子量多糖類の解析

多山賢二\*<sup>1</sup>, 荒木 彩<sup>2</sup>, 岡本洋子<sup>3</sup>  
(令和4年(2022年)2月9日受理)

### Analysis of high molecular polysaccharides in commercial fermented milk and fermented food using commercial product as starter

Kenji TAYAMA<sup>1</sup>, Aya ARAKI<sup>2</sup> and Yoko OKAMOTO<sup>3</sup>

#### Summary

It has been reported that *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produce polysaccharides, and their ability to produce polysaccharides varies depending on the strain. Among them, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073 R-1 strain, which has a large production ability, has been used for manufacturing of R-1 yogurt (Meiji Co., Ltd.) in the form of being mixed with *Streptococcus thermophilus*. We focused on the fact that substances with physiological activity are high molecular weight polysaccharide. We constructed a simple gel filtration system using an open column, and found that high molecular weight polysaccharides and low molecular weight polysaccharides can be easily separated. We analyzed prototypes that had been fermented at 37°C or 30°C for 1 to 3 days using milk, sugars and R-1 cup type commercial products as starters using this system. As a result, it was clarified that the contents of the high molecular weight water-soluble polysaccharides having a molecular weight of 2000 kDa or more have lot differences in the commercial products used as starters, and the polysaccharides was accumulated to the same concentration as the products in the prototypes. The high molecular weight polysaccharides obtained from the prototype by gel filtration were 94 % neutral polysaccharides with Gal : Glc = 3 : 2, which were consistent with those of the commercial product.

**Key words:** Lactic acid bacteria, polysaccharide, molecular weight, fermented food

**要旨:** 乳酸菌のブルガリカス菌は多糖類を生成するが、その生成能は菌株によって異なることが報告されている。その中で、生成量が多いブルガリカス菌 OLL1073 R-1 株は、乳酸菌のサーモフィルス菌との混合発酵の形で、(株)明治の R-1 ヨーグルトの製造に利用されている。生理活性を有する物質が高分子量多糖類であることに我々は着目し、まずオープンカラムを用いた簡単なゲルろ過システムを構築し、R-1 ヨーグルト中の高分子量多糖類と低分子量多糖類とを容易に分画できることを示した。次にこのシステムを使用し、市販牛乳、糖類、スターターとして R-1 のカップタイプの製品を使用し、37°C もしくは 30°C で 1～3 日の発酵を行った試作品を解析した。その結果、分子量が約 200 万の高分子量の水溶性多糖類量は、スターターとして用いた製品においてロット差があること、試作品において製品並みの濃度まで蓄積できるものも明らかとなった。試作品からゲルろ過によって得られた高分子量の多糖類は、94%が中性多糖類で、Gal:Glc = 3:2 の構成糖から成り、製品のそれと一致した。

**キーワード:** 乳酸菌, 多糖類, 分子量, 発酵食品

\*連絡責任者・別冊請求先 (Corresponding author, E-mail: ktayama@shudo-u.ac.jp)

広島修道大学 (731-3195 広島県広島市安佐南区大塚東一丁目1番1号)

Hiroshima Shudo University, 1-1-1, Ozukahigashi, Asaminami-ku, Hiroshima 731-3195, Japan

<sup>1</sup>広島修道大学 健康科学部 <sup>2</sup>長崎県立大学 看護栄養学部 <sup>3</sup>元広島修道大学 健康科学部

## 緒言

近年、各食品メーカーから機能性ヨーグルト（発酵乳）が発売され、我々消費者は、その選択に迷うほどになっている。国内の発酵乳の市場規模は、踊り場状態にあるとはいえ、2018年度で3700億円を超える規模<sup>1)</sup>を形成している。

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（ブルガリカス菌）が発酵乳の製造に伝統的に用いられてきた中で、この菌と同定される乳酸菌が生成する多糖類について調べられており、菌株によってこの生成能は大きく異なることが報告されている<sup>2,3)</sup>。多糖類生成能が顕著に高い菌株として選抜された *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073 R-1 株（以下、R-1 菌）は、その生成する多糖類が、後の研究によって免疫活性化の作用を有することが示されている<sup>2-8)</sup>。本菌および *Streptococcus thermophilus* (No. 1131) を用いて製造された発酵乳は、(株)明治によって製品化され（以下、R-1 製品）、現在も広く市販されている。

我々は、この R-1 製品中の多糖類に興味を持ったことから、この製品の解析を行うこととしたが、一層注目したことは、R-1 製品では同じ多糖類であっても、高分子量（分子量 100 万程度以上）のものでないと免疫活性化能を示さない点である<sup>3,8)</sup>。このことは重要であり、ゲルろ過システムにおいてクロマトグラフィーの初期に溶出される高分子量画分の多糖類の量を見極める必要性があることを示している。そこで我々は、まずミニカラムを用いて簡便に高分子量多糖類を定量する系の構築を目的とした。検討の結果、簡便に解析できることが明らかとなったため、次にこの系を用いて調べたところ、R-1 製品のロット間で高分子多糖類量に違いがあることを見出し、さらに製品をスターターとして牛乳を発酵させて得た試作品が R-1 製品と同等レベルの高分子量多糖類を含むことが示されたので報告する。

## 実験方法

### 1. サンプル、試薬および試作品

#### (1) サンプル、試薬

R-1 製品としては、明治 R-1 ヨーグルト「カップタイプ (112g 入り)」とし、2020年2月から2021年11月の期間に広島市内の小売店（スーパーマーケットやコンビニエンスストアなど）で購入し、使用まで冷蔵庫（4℃）に保管した。使用に当たっては賞味期限内であることを確認した。発酵乳の試作に用いる牛乳も、上記同様に購入・保管・使用し、雪印メグミルク製のものを用いた。試作に

用いたスクロースは、砂糖としての上白糖（三井製糖製）を使用し、グルコース、フルクトースおよびL-アスコルビン酸は、和光純薬製の特級品を用いた。

分析・調製用試薬としての、フェノール、硫酸、塩酸、エタノール（99.5%）、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、ペルオキシ酸カリウム、塩化ナトリウムは、和光純薬製の特級品を使用した。その他、グルコース測定キット（CII-テストワコー；和光純薬製）、D-ガラクトース測定キット（F-キット；J.K. インターナショナル社）、透析膜（ヴィスキングチューブ、分画分子量 12000~14000、アズワン製）、ポアサイズ 5 μm フィルター（Sartorius 社製、Minisart NML）、BIOMOL Green（Enzo 社製）、Sephacryl S-400 HR（GEヘルスケア製）、トリス-アミノメタン（SERVA 社製）、陰イオン交換樹脂 Macro-Prep DEAE Media（BIO-RAD 社製）、Protein Assay Dye Reagent Concentrate（Bio-Rad 社製）、分子量が 200 万、50 万および 2 万のブルーデキストラン（Sigma-Aldrich 社製）、および N-DNP-L-アラニン（東京化成工業製）を用いた。

#### (2) 試作品の調製方法

市販牛乳 100 mL に砂糖・グルコース・フルクトース・液糖などの糖類を 200 mL に対する濃度（W/V）で添加し、電子レンジ（500 W）で 60 秒間加熱して溶解した。40℃程度まで冷却後、これに R-1 製品（2g~40 g；1%から 20%分）と 37℃の牛乳を、全体容量が 200 mL になるよう加え、37℃で 24 時間（1 日）もしくは 30℃で 72 時間（3 日）発酵させた。容器は殺菌したビーカーを用い、サララップと輪ゴムで蓋をした。

#### 2. 多糖類の分画方法

50 mL 容量のプラスチック遠心管に、40 g の室温にしたサンプルを入れ、これに 50%（W/V）トリクロロ酢酸を 4 mL 加え十分に混合した。タンパク質の凝集を促進させるため、55℃で 10 分間放置した。その後これを 10000 rpm、4℃、20 分間遠心分離を行い、上清を 5 μm のフィルターでろ過した。得られた清澄なる液を透析膜に入れ、100 万倍以上希釈できるよう水に対して透析した。得られた透析物をエタノール沈殿物として回収する場合には、2 倍量に相当する冷エタノールを透析物に加えて穏やかに混合後、冷蔵庫（4℃）で一晩放置した。これを上記同様に遠心分離して上清を別容器に保管後、沈殿部分は容器ごと 60℃で 30 分間乾燥させた。次に脱イオン水を 0.1 mL ずつ順次加えて沈殿部分を溶解していったが、水溶液の粘性を観察しながら 0.3~1 mL の範囲とした。その後さらに 50℃で 1 時間放置して十分に溶かした。一方、別の実験では、40g のサンプルを

用い、上記同様の操作で得られた透析物をエタノールで沈殿化することはせず、透析物を直ちにエバポレーターで1~2 mLまで濃縮して、一部をゲルろ過に用いた。

### 3. カラムクロマトグラフィー

#### (1) 70 cm ゲルろ過 (ロングサイズ)

φ10mm×730mmのガラスカラムの上端近くまでゲルろ過担体 (Sephacryl S-400 HR) を詰め、0.1 M NaCl で平衡化した。エバポレーターで濃縮したサンプル(多糖濃度に応じて最小1.0 mL~最大1.5 mL)を上部から注入し、約8 mL/hrの流速で流し、溶出液を1 mL程度ずつ集め、分析した。

#### (2) 5 cm ゲルろ過 (ミニサイズ)

テルモ社製のプラスチックディスポ注射筒(10 mL容量)を用い、これに上記のゲルろ過担体(約10 mL容量分)を詰め、0.1 M NaCl で平衡化した。エバポレーターで濃縮したサンプルの一部(0.15 mL)を上部から注入し、約5 mL/hrの流速で流し、最少で溶出液を0.3 mL程度ずつ集め、分析した。

#### (3) DEAE クロマトグラフィー

ミニサイズのゲルろ過同様のカラムを用い、Macro-Prep DEAE Media(約7 mL容量)を詰め、10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)で平衡化した。この担体に吸着させた成分は0.5 M NaClを添加した緩衝液で溶出させた。

### 4. 分析方法

#### (1) 多糖類含量の測定

長さ50 mmのガラス試験管にサンプルを150 μL入れ、ここに5% (W/V) フェノールを150 μL加えて混ぜた。室温で15分放置後、硫酸を750 μL加えて直ちによく混ぜ、15分放置後に486 nmの吸光度を測定した。50 mg/Lのグルコース溶液を標準とし、グルコース相当量として多糖類濃度を算出した。

#### (2) 結合型リン酸量の測定

まず多糖類等の高分子から脱リン酸処理を行った。すなわち、エッペンドルフチューブ(1.5 mL容量)にサンプルを0.2 mL加え、ここに4% ペルオキソ二硫酸カリウム水溶液を40 μL加え、120°C、40分間の加熱処理を行った。次に遊離リン酸の定量は、BIOMOL Greenのキットを用いる比色法で行い、サンプル0.1 mLに試薬を1 mL加え30°Cで25分放置後に、620 nmの吸光度を測定する方法を用いた。標準溶液は80 μMリン酸を用いた。

#### (3) 蛋白含量の測定

Protein Assay Dye Reagent Concentrate をサンプル量の1/4量加え、室温で15分放置後に、595 nmの吸光度を測定した(Bradford法)。蛋白のスタンダードとしてはBSA(牛血清アルブミン)

を用いた。

#### (4) 核酸含量の測定

260 nmの吸光度を測定し、核酸が全てDNAとみなして、260 nmの吸光度1.0を50 μg/mLとして算出した。

#### (5) 核酸分解処理物の分析

DNase I (12 units/μL)の製品に添付されていた緩衝液を、880 μLのサンプルに対して100 μL加えた後、DNase IおよびRNase Aを各々10 μL加え、37°Cで16時間反応させた。反応終了後、2 mLの冷エタノールを加えて一晚放置後、上述の多糖類の分画方法に準じて不溶化多糖類を遠心分離で回収し、脱イオン水に溶解して溶液とした。この溶液を用いて結合型リン酸濃度と多糖類濃度を測定した。

#### (6) 多糖類の構成糖の分析

部分精製した多糖類の水溶液に対して、トリフルオロ酢酸(TFA)を最終濃度が2 Mとなるよう添加後、100°Cで3時間加水分解処理を行った。加水分解後、脱イオン水を少量添加し、エバポレーター(50°C)で乾固させる処理を4回繰り返してTFAを除去した。最後の乾固物に少量の脱イオン水を加えて溶解後、その一部を使用し、グルコースおよびガラクトースの濃度をキットを用いて測定した。

### 実験結果

#### 1. R-1製品の解析

多糖類の分画・分析を行っていくに際し、現行のR-1製品の中身について知っておくことが重要であるため、この解析をまず行った。R-1製品(ロットA)の除蛋白を行い、これを透析して得た透析内液部分について、濃縮後、ロングサイズのゲルろ過を行った。図1に示されるように、多糖類で大きな2ピークが認められ、多糖類の分子量マーカーの溶出位置から算出したところ、表1に記したように、31 mL溶出画分付近は分子量が200万程度であった(以下、高分子量多糖類と呼ぶ)。一方48 mL~54.5 mL溶出画分付近は分子量が7万~2万であった(以下、低分子量多糖類と呼ぶ)。ただし、図1に見られるように、後ろ側のピークの領域で、核酸(DNAなど)に由来すると思われる260 nmの吸収があり、20 mg/L(DNA)に匹敵する最高濃度が検出された。また、蛋白が最高で40 mg/L相当の画分も存在した。さらには(藤明治が報告しているように<sup>3-6)</sup>、高分子に結合しているリン酸も含まれており、その濃度は今回の我々の分析では50 mg/Lのレベルまで到達した画分もあった。これらの結果は、除蛋白処理物を透析して得た高分子画分ではあったが、除蛋白は



完璧に行われることは難しく、結果として原材料の乳製品や乳酸菌由来の蛋白や核酸（DNA など）が残存していることを示している。

## 2. ゲルろ過の簡便化

上記 1 とは異なる R-1 製品（ロット B および C）の除蛋白物の透析内液 2 種類について、濃縮後、ミニサイズのゲルろ過を行った結果を図 2 に示した。ロングサイズ（図 1）ほどの分画はできなかったものの、図 1 と比較すると、溶出液量 6 mL を境界として、これより前を高分子量多糖類として、これより後ろを低分子量多糖類として見なせると判断した。この結果を受けて、クロマトグラフィーをより一層簡便化するために、溶出液量が 3.7 mL から 5.7 mL の部分および 6.9 mL から 9.4 mL の部分の一つの画分として集め、最初の画分を 2.5 mL 集める以外は、他の画分を約 0.3 mL ずつ集め、分析本数を減らす試みを行った。上記とは別ロットの R-1 製品（ロット D）を用いた結果を図 3 に示した。約 2 mL を集めたフラクション番号 6 番および約 2.5 mL を集めたフラクション番

号 11 番はともに高い多糖類濃度を示したことから、図 2 のように 0.3 mL ずつ約 40 本の分析を行う必要は特になく、図 3 のように 15 本の分析を行う簡便法で多糖類を分析していくことで問題ないと判断した。すなわち、図 4 に示された中で、フラクション番号の 2 番から 7 番の合計量を高分子量多糖類量とみなし、8 番から 15 番の合計量を低分子量多糖類量とみなすこととした。

## 3. 製品および試作品の解析

牛乳、糖類（スクロース、グルコース、フルクトース）、スターター（R-1 製品カップタイプ）を混ぜて、37°C で 24 時間（1 日）もしくは 30°C で 72 時間（3 日）発酵させて作った試作品に関して、高分子量多糖類と低分子量多糖類の含量を調べた結果を図 5 に示した。一部には溶液内の溶存酸素レベルを低下させ、乳酸菌の活性化を期待して L-アスコルビン酸を加えた。スターターとして用いた R-1 製品は、高分子量多糖類の蓄積量が最大と最小で 2 倍以上の開きがあったことに加え、高分子量と低分子量を合計した総多糖類量として

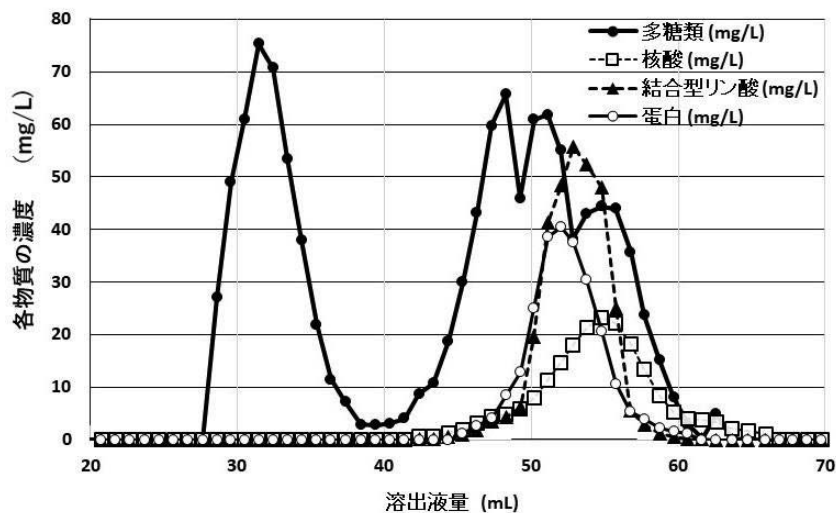


図 1. 市販 R-1 製品（ロット A）の除蛋白後の高分子（透析内液）画分のロングサイズゲルろ過クロマトグラフィー

表 1. ロングサイズゲルろ過で溶出された各種高分子のピークでの推定分子量

溶出位置	種類	分子量	溶出位置	種類	分子量
31 mL	多糖類	2000 kDa	54.5 mL	核酸	20 kDa
48 mL	同上	70 kDa	52 mL	蛋白	20 kDa
51 mL	同上	45 kDa	53 mL	P-多糖類	30 kDa
54.5 mL	同上	20 kDa			

- 1) 核酸は多糖類同様の溶出位置を示すとして算出
- 2) 蛋白は、クロマト担体製品に添付されていたパンフレットの蛋白用グラフを用いて、蛋白の分子量として算出
- 3) P-多糖類;リン酸化多糖類

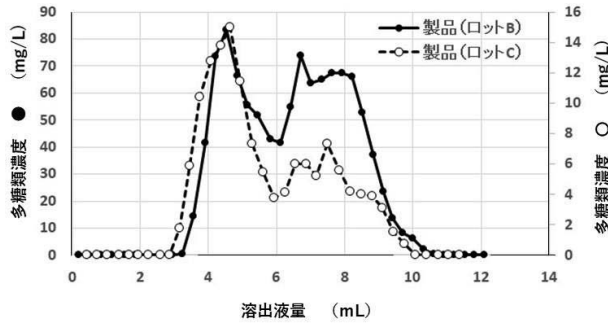


図2. 市販R-1製品の除蛋白後の高分子(透析内液)画分のミニサイズゲルろ過クロマトグラフィー

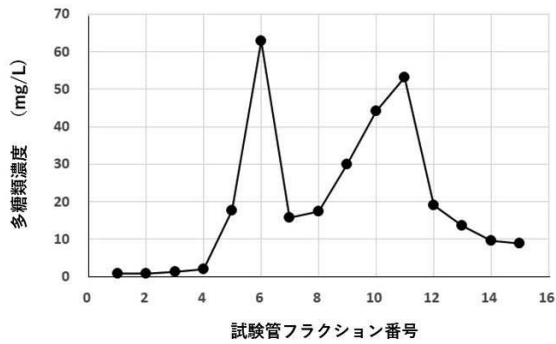


図3. 市販R-1製品(ロットD)の除蛋白後の高分子(透析内液)画分のミニサイズゲルろ過クロマトグラフィーでの多糖類濃度変化

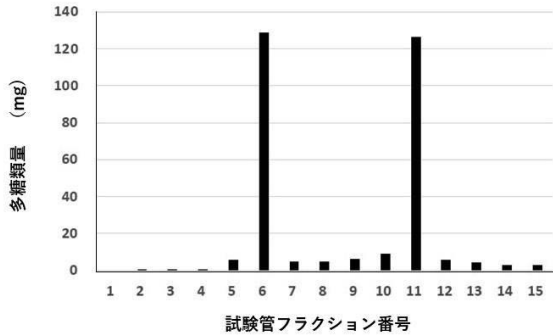


図4. 市販R-1製品の除蛋白後の高分子(透析内液)画分のミニサイズゲルろ過クロマトグラフィーでの多糖類絶対量変化

見た場合では、最大と最小とで約3倍の違いが認められた。スターターの使用割合を20%とし、グルコースとフルクトースで1日発酵させた試作品が、スターターの2倍程度の高分子量多糖類を蓄積させたものの、この蓄積濃度は別のロットのスターター(R-1製品;ロットH)と同等レベルであった。

次に別ロットのR-1製品(ロットI)およびこれをスターターとして20%使用し、スクロース

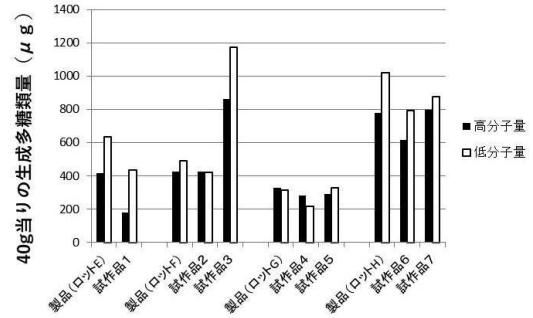


図5. 製品およびそれをスターターとして発酵させた試作品のミニサイズゲルろ過による分画結果

試作品1;スターターEを10%使用した3%Glc+3%Frc+0.02%L-AsA(1日発酵), 試作品2;スターターFを1%使用した3%Glc+3%Frc(3日発酵), 試作品3;スターターFを20%使用した3%Glc+3%Frc(1日発酵), 試作品4;スターターGを1%使用した3%Glc+3%Frc+0.02%L-AsA(3日発酵), 試作品5;スターターGを10%使用した3%Glc+3%Frc(1日発酵), 試作品6;スターターHを15%使用した3%Suc+3%Frc(1日発酵), 試作品7;スターターHを20%使用した3%Suc+3%Frc(1日発酵). Glc;グルコース, Frc;フルクトース, Suc;スクロース, L-AsA;L-アスコルビン酸

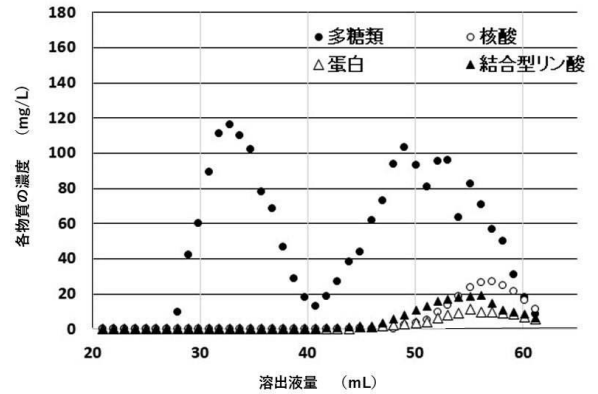


図6. 市販R-1製品(ロットI)のロングサイズゲルろ過による解析

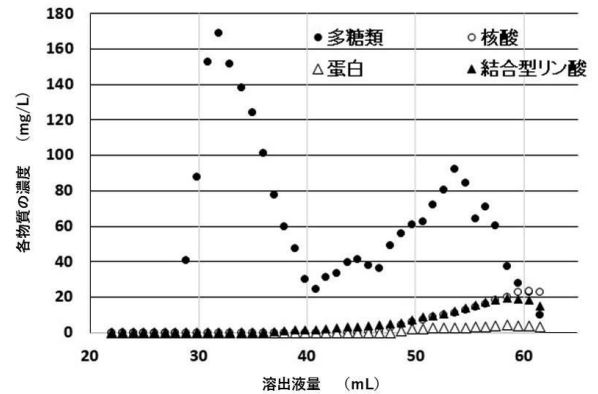


図7. 試作品のロングサイズゲルろ過による解析

およびフルクトースを共に 3 %使用して 37°C, 24 時間発酵させた試作品について, ロングサイズのゲルろ過を行った結果を, 図 6 (R-1 製品) および図 7 (試作品) に示した (サンプル使用量は両者共に 60 g)。R-1 製品と比較して試作品では, 高分子量多糖類の量が多い傾向が認められ, 図 5 で得られた結果 (R-1 製品ロット H と試作品 7 がほぼ同等レベル) とは, やや異なった。

#### 4. スターターとしての製品およびそれを用いて得た試作品から回収した多糖類の比較解析

まず図 6 および図 7 で得られた各高分子量多糖類画分 (溶出液量が 30 mL~37 mL の画分) をエバポレーターで濃縮後, 水に対して透析した。次に陰イオン交換の DEAE カラムに注入し, 素通り画分 (中性画分) を集めた。構成糖の分析に際しては, エバポレーターで濃縮したものを使用した。

クロマトグラフィーの結果, R-1 製品ではカラムに投入した多糖類の 92 %が素通り画分として回収され, 試作品では 94 %が回収され, ほぼ同じ回収率であった。また, 濃縮した各サンプルを酸加水分解後, これに含まれるガラクトース (Gal) とグルコース (Glc) の濃度を測定し, 濃度比を算出した。その結果, R-1 製品では Gal:Glc = 1.45:1.00, 試作品では Gal:Glc = 1.48:1.00 であり, 共に Gal:Glc=3:2 のモル比で構成されている多糖類であることが示された。

#### 考察

本研究の当初の目的は, ミニカラムを用いて高分子量多糖類を簡便に定量分析することであったが, R-1 製品に含まれる多糖類が, 中途半端なサイズのものがなく, 分子量 200 万程度の高分子量と分子量 2 万~7 万の低分子量に大別できたことから, 特に大きな問題点は発生せず, 解析システムを構築できた。解析法が整ったことから, 次に R-1 製品を購入し, この製品をスターターとして牛乳の発酵品を試作し, 各々に含まれる高分子量多糖類の量を比較する実験に移行した。その結果, R-1 製品に含まれる高分子量多糖類量は, ロットによって異なることが示された。図 5 で示されているように, 最大と最小で 2 倍以上の違いが認められ, 多糖類蓄積量まで含めた厳密な発酵管理は想像以上に困難を伴うことが示唆された。

R-1 製品から除蛋白後の透析のみによって得た総多糖類は, 上述のようにゲルろ過によって分子量が明確に異なる 2 つのグループに分かれることが, 今回の解析から明らかとなった。核酸, 蛋白およびリン酸化された多糖類は, いずれも平均分子量が 3 万以下のサイズであること, 平均分子量が 200 万程度の高分子量多糖類も含まれてい

るが, この中にはリン酸は含まれていないことも明らかとなった。(株)明治の論文<sup>5,6,8)</sup>では高分子量の精製多糖類はリンとして 0.1 %,つまりリン酸としてなら 0.3 %含むとしていることから, 食い違う結果となった。そこでこれについて考察するため実験を追加した。

まず R-1 製品 (ロット J) から除蛋白, 透析, エタノール沈殿によって回収したエタノール不溶性画分を用いて, DEAE クロマトグラフィーを行ったところ, 素通り画分と吸着画分に分けることができた。カラムに注入した多糖類はグルコース換算で 320  $\mu$ g であり, 素通りの中性画分は 213  $\mu$ g, 吸着後に 0.5 M NaCl で溶出される酸性画分は 116  $\mu$ g であったことから, 中性多糖類:酸性多糖類=2:1 に近い比率で R-1 製品中に存在していることが示唆された。高分子結合型リン酸は, クロマトグラフィー前には 249  $\mu$ g あったが, 中性画分には全く検出されず, 酸性画分に 89  $\mu$ g が回収された (カラムに注入した内, 約 2/3 はこの条件では溶出されなかった)。蛋白は, クロマトグラフィー前が BSA 換算で 26  $\mu$ g 含まれており, 素通りの中性画分にのみ蛋白の存在が認められたものの, その量は 4  $\mu$ g にすぎず, 今回の条件では多くが溶出されなかった。

DEAE カラムから溶出された酸性高分子画分は, Bradford 法による分析で蛋白は全く含まれなかったことから, この酸性高分子は糖とリン酸から構成されていることになり, 計算の結果, リン酸の含量は重量比で約 40 %であった。次に, これにリン酸を含む核酸 (DNA, RNA) が混入していることがないかを判定するため, 核酸の酵素分解処理を行い, リン酸含量の変化が認められるか調べた。その結果, DNase と RNase を加えないサンプルでは結合型リン酸の濃度が 10.6 mg/L であったのに対し, これらの核酸分解酵素を加えた場合は 3.4 mg/L まで濃度が減少していた (多糖類濃度は共に 13 mg/L で変わらず)。すなわち全体の少なくとも 7 割程度のリン酸は, 高分子の核酸に由来していることが示唆された。計算の結果, 酸性高分子中のリン酸含量は 20 %程度と算出された。一般に細菌が生成するリン酸化多糖類は, 構成糖に対するリン酸の分子比率は少ない場合でも半分程度あることから<sup>9)</sup>, 多糖類全体に占めるリン酸の重量比率は, 少なくとも 20 %と算出される。

さらに, R-1 製品から除蛋白して得た高分子画分のゲルろ過 (図 1) において, 53 mL 溶出付近 (低分子量多糖類を含む画分) では, 結合型リン酸含量が多糖類含量を上回っていた。核酸の混入もありうるため判断は慎重に行う必要はあるものの, リン酸の含量が重量の 10 %以上含まれる平均



分子量が3万程度のリン酸化多糖類が存在している可能性があることを示唆している。(株)明治の結果とは異なるが、今回の我々の実験結果は、R-1製品中に含まれる酸性多糖類が、リン酸を重量比率で10~20%程度含み、平均分子量が3万程度の比較的分子量の低いリン酸化多糖類である可能性を示唆している。双方の結果の不一致の原因解明には、さらなる詳細な検討が必要である。一方、平均分子量が200万の高分子量多糖類中で6~8%を占めるとされる酸性多糖類については、リン酸以外の酸性の修飾基の存在を想定すべきであろう。硫酸基やピルビン酸残基の他、ウロン酸が構成糖として微量含まれる可能性などが検討すべきターゲットと考えられる。

R-1製品に関しては、免疫力を高める本体が、R-1乳酸菌が生成する多糖類であること自体は、(株)明治はホームページで一貫して説明している一方で、その中身については変わってきている。最初の論文が出された1998年以降、日本乳酸菌学会誌に総説が掲載された2013年までは、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073 R-1株が生成する分子量が約120万の「酸性多糖類」が有効成分であるとしていた<sup>3,4)</sup>。しかし、2015年に公開された出願特許<sup>10)</sup>では、R-1菌が生成する分子量が約430万の「中性多糖類」がナチュラルキラー細胞の活性を上昇させることができ、ウイルス感染前から予防的効果が期待できるとしている。同年には、この中性多糖類の構造決定の論文<sup>11)</sup>も出されている。これらの情報を整理すると、R-1菌が生成する多糖類は、分子量が100万を超えていれば、中性、酸性に関係なく免疫を強化できると思われる。試作品を用いて得た図7の30~37mL溶出画分(平均分子量が約200万)の多糖類は、構成糖のモル比としてGal:Glc=3:2であり、(株)明治の論文<sup>10,11)</sup>と一致した。この画分の多糖類を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果、94%が中性多糖類であった。この数値は、R-1製品の結果とほぼ一致した。これらの結果から、図7の試作品はR-1製品と同様な生理活性を示すことが期待される。

牛乳と糖類を用いて試作した発酵乳において、スターターとして用いたR-1製品以上に高分子量多糖類を蓄積させることは簡単ではなかった。図6で使用したR-1製品および図7の試作品は、サンプル40g当りで計算すると、高分子量多糖類の量が、各々587 $\mu$ gおよび812 $\mu$ g、低分子量多糖類の量が、各々826 $\mu$ gおよび704 $\mu$ gであった。図5,6の結果も合わせて考えると、スターターとしての製品を20%使用すれば、製品中のR-1菌の状態が多少変動しても「40g当り800 $\mu$ gの高

分子量多糖類」を蓄積させることができる可能性が示唆された。

高分子量多糖類ではないが、除蛋白物の透析内液に関して、R-1製品中の総多糖類量を長期間に渡って我々が調べた結果を図8にまとめた。発酵

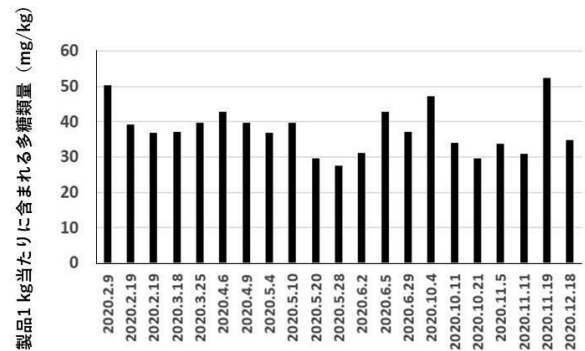


図8. 賞味期限の異なるR-1製品の除蛋白後の透析内液に含まれる多糖類総量

食品であるため、ある程度のロット差が認められた。図5を含む上述の結果から推定すると、透析内液に含まれる多糖類の内、約1/2は生理活性を有する高分子量多糖類の可能性があり、R-1製品中には1kg当たり20mg前後の免疫を活性化する機能を有する多糖類が含まれていることが示唆された。マウスを用いた実験において、ガン患者に見られる骨格筋の減少を特徴とする複合的な代謝障害に対してR-1乳酸菌の多糖類が抑制的に働くことを示すデータ<sup>12)</sup>が出されており、今後も注目を集める多糖類と思われる。

## まとめ

ブルガリカス菌 OLL1073 R-1株とサーモフィルス菌の混合発酵により、(株)明治のR-1ヨーグルトは製造されている。生理活性を有する物質が前者の菌株が生成する高分子量多糖類であることに着目し、まずオープンカラムを用いた簡単なゲルろ過システムで、R-1ヨーグルト中の高分子量多糖類と低分子量多糖類とを容易に分画できないか調べた。その結果、システムを構築できたことから、これを利用し、牛乳、糖類、スターターとしてのR-1製品を使用して37°Cもしくは30°Cで1~3日の発酵を行った試作品を解析した。分子量が200万の高分子量の水溶性多糖類量は、スターターとして用いた製品においてロット差があること、試作品においては製品並みの濃度まで蓄積したのもあった。試作品からゲルろ過によって得られた高分子量多糖類は、94%が中性多糖類で、Gal:Glc = 3:2の構成糖から成り、製品のそれと一致した。

## 文献

- 1) <https://bio.nikkeibp.co.jp/atclyb/20/120500102/> 日経バイオ年鑑 2020【食品】 プロバイオティクス 市場規模
- 2) 明治：乳酸菌のスクリーニング方法, 当該方法により選抜された乳酸菌, 並びにその乳酸菌を含む抗ウイルス剤および飲食品組成物, 公開特許公報, 特開 2011-139700, 7 月 21 日 (2011)
- 3) 牧野聖也, 池上秀二：ヨーグルト乳酸菌が産生する菌体外多糖の利用と培養条件の影響, 日本乳酸菌学会誌, **24**, 10-17 (2013)
- 4) Kitazawa H., Harata T., Uemura J., Saito T., Kaneko T. and Itoh T.: Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *International Journal of Food Microbiology*, **40**, 169-175 (1998)
- 5) Uemura J., Itoh T., Kaneko T. and Noda K.: Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *Milchwissenschaft*, **53**, 443-446 (1998)
- 6) 明治乳業：NK 細胞活性化剤, 公開特許公報, 特開 2005-194259, 7 月 21 日 (2005)
- 7) Makino S., Ikegami S., Kano H., Sashihara T., Sugano H., Horiuchi H., Saito T. and Oda M.: Immunomodulatory effects of polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *Journal of Dairy Science*, **89**, 2873-2881 (2006)
- 8) 明治：NK 細胞活性化剤, 公開特許公報, 特開 2017-14231, 1 月 19 日 (2017)
- 9) 鳴海孝佑, 積田 亨; 自然界のリン酸化多糖質, *生化学*, **40**, 1-14 (1968)
- 10) 明治：発酵乳および抗ウイルス剤の製造方法, 公開特許公報, 特開 2015-70855, 4 月 16 日 (2015)
- 11) Van Calsteren M.-R., Gagnon F., Nishimura J. and Makino S.: Structure determination of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1, *Carbohydrate Research*, **413**, 115-122 (2015)
- 12) 明治：癌性悪液質抑制作用を有する発酵乳お