

ノート

市販発酵乳をスターターとして試作した食品中での乳酸菌の増殖

多山賢二¹, 荒木 彩^{2*}, 黒飛知香³, 岡本洋子⁴
(令和 5 年 2 月 2 日受理)

Growth of lactic acid bacteria in fermented food using commercial product as starter

Kenji TAYAMA¹, Aya ARAKI^{2*}, Tomoka KUROTOBI³ and Yoko OKAMOTO⁴

Summary

It has been reported that *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduce body fat in obese people by continuously ingesting more than one billion cells every day. We used 1-10% commercial products (Megumi gasseri SP yogurt) of Megmilk Snow Brand Co., Ltd., which contains this viable lactic acid bacteria as a starter. Commercial milk, sugar, etc. were used, and fermentation was performed at 37°C or 30°C for 1 or 3 days. The number of viable cells of the bacteria was measured for the prototype and the commercial products. As a result, it was indicated that there were lot differences in the commercial product used as a starter, and that some prototype showed the same concentration of bacteria as the commercial products. The highest bacteria concentration of prototype was 1.8×10^8 CFU/g, when 10% each of starter, sucrose, and commercially available sterilized lactic acid bacteria beverage were used and fermented at 37°C for 24 hours in commercial milk. This concentration was significantly higher than the commercial product used as starter.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus gasseri*, fermented milk, bacteria concentration

要旨: 乳酸菌のラクトバチルス ガセリ SBT2055 株は、10 億個以上の摂取を毎日継続することによって、肥満気味の人々の体脂肪を減らすことが報告されている。そこで、この乳酸菌を生きた状態で含む (株)雪印メグミルク製の恵ガセリ菌 SP ヨーグルト製品をスターターとして 1%~10%使用し、市販牛乳、糖類などを使用し、37°Cもしくは30°Cで1日もしくは3日の発酵を行った試作品について本菌の生菌数を測定した。その結果、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菌濃度を示すものもあることが明らかとなった。最高の菌濃度を示した試作品は、スターター、砂糖、市販の殺菌乳酸菌飲料を各 10%使用し、37°Cで 24 時間、発酵させたものであり、1g 当り 1.8×10^8 CFU/g の本菌が含まれていた。この濃度は、スターターとして用いた製品よりも有意に高かった。

キーワード: 乳酸菌, ラクトバチルス ガセリ, 発酵乳, 細菌濃度

*連絡責任者 Corresponding author, E-mail: aaraki@sun.ac.jp

長崎県立大学 (851-2195 長崎県西彼杵郡長与町まなび野一丁目 1 番 1 号)

University of Nagasaki Siebold Campus, 1-1-1 Manabino, Nagayo-cho, Nishi-Sonogi-gun, Nagasaki 851-2195, Japan

¹ 県立広島大学 地域創生学部 ² 長崎県立大学 看護栄養学部 ³ 広島修道大学 健康科学部

⁴ 元広島修道大学 健康科学部, 一般社団 おいしさの科学研究所

緒言

国内の発酵乳の市場が、2020年で5,000億円弱規模と推定されている¹⁾中で、各食品メーカーからは様々な機能性を有するヨーグルト(発酵乳)が発売されている。(株)明治が提供している「明治プロピオヨーグルト R-1」は代表例といえるが、商品ラベルに機能性の表示はなされていない。一方、雪印メグミルク(株)が発売している「恵megumi ガセリ菌 SP株ヨーグルト」は、特定保健用食品としての表示許可を受けており、脂肪の吸収を抑制する機能などを有することから、肥満抑制に寄与できるとされている。このヨーグルトの関与成分(有効成分)は、*Lactobacillus gasseri* SBT2055株²⁾であり、メーカーの最低保証菌数は製品1個(100g)当たり10億個(1×10^7 CFU/gの生菌濃度に相当)である。

この肥満予防という機能は発酵乳の中ではほとんど例がなく、他社品では近年に発売された(株)明治の「明治脂肪対策ヨーグルト」があり、*L. plantarum* OLL2712株が肥満気味の人の腹部総脂肪を減らすとされている³⁾。

我々は、ガセリ菌 SP株ヨーグルトの製品には生きた状態で機能性を有する有用な乳酸菌が含まれていることに着目し、この製品をスターターとして牛乳を発酵させて得られた試作品にも同様に、*L. gasseri* 菌が含まれるか調べることにした。

基本となる原材料は市販牛乳と砂糖としながらも、スターター量、発酵温度、時間を変え、砂糖に代わる糖質についても検討した。また、還元的环境下とするためのL-アスコルビン酸の添加や、栄養源の追加のため豆乳や殺菌乳酸菌飲料、ポリペプトンの添加を行った。その結果、条件によっては製品並みに含まれることが明らかになったので報告する。

実験方法

1. 材料および試験液の調製

(1) 実験材料

2020年10月~2022年4月に、「恵megumi ガセリ菌 SP株ヨーグルト」(カップタイプ; 100g入り)を広島市内のスーパーマーケットもしくはコンビニエンスストアで購入した。試作に用いる原材料の牛乳はコンビニエンスストアで購入し、雪印メグミルク製の「毎日の食卓牛乳」を用いた。試作に用いた砂糖は上白糖(三井製糖製)を、殺菌乳酸菌飲料としてのカルピス(470 mL入り、5倍希釈用)はアサヒ飲料製を、グルコース、フルクトース、L-システイン塩酸塩、リン酸

水素二ナトリウム、Tween 80、L-アスコルビン酸およびリン酸二水素カリウムは、和光純薬製の特級品を用いた。寒天末はナカライテスク製(一級品)を、ポリペプトンは日本製薬製を、豆乳は有機豆乳 無調整(マルサンアイ製)を用いた。

(2) 市販品の保管方法

製品を購入した後の搬送は、クーラーボックスに保冷剤を入れた状態で行い、使用まで冷蔵庫(4℃)にて保管した。試作のためのスターター(種菌)として使用する場合は、賞味期限までに用いることとした。

(3) 乳酸発酵食品(試作品)の調製

乾熱滅菌した200 mL容量のガラスビーカーに、糖類、試薬、牛乳など、発酵乳以外の原材料を入れ、滅菌コンラージ棒で混合して溶解可能な固形物は溶かし、その後電子レンジで10秒ずつ加熱しながら温度を測定し30℃まで液温を上昇させた。ここに、25℃程度の室温で1時間放置したスターターとしての市販発酵乳を、規定の重量添加し、滅菌コンラージ棒で攪拌した。この時点で、液体総量が100 mLとなるよう、牛乳の使用量を事前に調整した。アルミホイルで蓋をし、30℃もしくは37℃の恒温器に移し、規定の時間、放置して発酵させた。

1)スターター量の影響 スターターとしての製品を、1%もしくは10%(w/v)使用し、砂糖を5%(w/v)用い、1%使用の場合は30℃で72時間発酵を、10%使用の場合は37℃で24時間発酵を行った。

2)L-アスコルビン酸の影響 スターターを10%、砂糖を5%使用し、37℃で24時間発酵させ、L-アスコルビン酸を0.05%(w/v)添加したものと、しないものを比較した。

3)単糖類の影響 スターターを10%、砂糖の代わりにグルコースおよびフルクトースを5%(w/v)使用し、37℃で24時間発酵させたが、これに上記同様L-アスコルビン酸を添加したのもも実験に加えた。

4)スターターと砂糖の添加量の影響 「5%スターター & 5%砂糖」および「10%スターター & 10%砂糖」について調べた(37℃, 24時間発酵)。

5)食品および実験試薬の添加の影響 スターター10%、砂糖10%(37℃, 24時間)の条件の中で、牛乳の1/9程度を他の液状食品や実験試薬溶液に置き換えた。食品は、市販豆乳の分子量3,000以下の画分もしくは殺菌乳酸菌飲料(5倍濃縮タイプ)を、実験試薬溶液は10%ポリペプトン溶液の分子量3,000以下の画分を用いた。

(4) 試験液の調製

菌数測定の前には、市販発酵乳や試作品を滅菌

コンラージ棒で固化物を破壊後、30秒間は攪拌して混合し均質化した。これを下記の希釈液に1/10重量加えて試験液を調製し、必要に応じてさらに段階希釈を行った。

2. 試薬および器具

(1) 希釈液の調製

希釈液は、リン酸二水素カリウム 4.5 g, リン酸水素二ナトリウム 6.0 g, Tween 80 0.5 g, L-システイン塩酸塩 0.5 g, 寒天末 0.5 g を脱イオン水 1 L に加えた後 (pH 6.8~7.0), オートクレーブで滅菌 (121°C, 15 分間) して調製した。

(2) 選択培地, 試薬および器具

培地は、MRS 寒天培地 (Difco 社製) を用いた。*L. gasseri* SBT2055 株の菌数測定のための選択培地⁴⁾は、雪印メグミルクによって設定されており、MRS 培地に下記のように2種類の抗菌剤を加えたものである。すなわち、MRS 培地を121°C, 20 分のオートクレーブ処理後、1 L の培地に対して、クリンダマイシン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬製) の 0.2 mg/mL 溶液を 0.5 mL, およびシプロフロキサシン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬製) の 2 mg/mL 溶液を 5 mL, 培地に加えた後にシャーレに分注して平板とした。培地中の最終濃度として、クリンダマイシン塩酸塩は 0.1ppm, シプロフロキサシン塩酸塩は 10ppm を示す。

この選択培地で出現するコロニーは PCR 法によって、本菌であることが雪印メグミルクによって確認されている⁵⁾。本菌は元々、薬剤耐性変異株として分離された経緯があり、発酵乳の製造に際しても、その特性⁶⁾が維持されている。著者らは予備実験により、本選択培地で出現してきた均一なコロニーが下記の特性を有しており、雪印メグミルクが提供する本菌の特徴^{4,7)}と一致することを確認した。すなわち、コロニー状態は、(1)白色、(2)円形、(3)表面は円滑、(4)周縁部が波状態、(5)直径が 2 mm 程度であり、(6)雪印メグミルクが提供しているコロニーの見本カラー画像と一致した。コロニーや培養液の顕微鏡観察では、(7)桿菌、(8)大きさ 0.5~1×3~4 μm, (9)連鎖したものが多く認められ、(10)運動性はなかった。また、独自に酸生成試験を行い、ポリペプトン、酵母エキスおよび酢酸ナトリウムを主体とし、炭素源としてスクロース⁸⁾を 2%(w/v), BCP を 0.02%(w/v)加えた培地⁹⁾において、増殖および指示薬の色の変化による酸生成を確認した。*L. bulgaricus* は桿菌ながら、スクロースからの酸生成能は有しない⁹⁾。これらのことから、上記の選択培地に出現するコロニーは *L. gasseri* SBT2055 株と判定した。

本菌の嫌気培養に使用する脱酸素剤のアネロパック・ケンキおよび透明嫌気ボックスのアネロパック角型ジャーは、三菱ガス化学製を用いた。

3. 生菌数測定方法

上記の寒天培地プレートに、各希釈液 50 μL もしくは 100 μL を表面塗抹し、37°C で 72 時間、嫌氣的に培養した。菌数は 3 回測定し、平均値±標準誤差を常用対数として結果の図に表示した。製品および試作品は固形物のため、1 g 当りのコロニー数として示した (CFU/g)。

4. 統計処理方法

多重比較検定では、分散が均一とみなせた場合には Tukey-Kramer 法を、均一とみなせない場合には Steel-Dwass 法を用いて検定した。各サンプル間の検定においては、危険率 5%以下で有意差ありと判定した。

5. 限外ろ過処理

市販豆乳および 10%(w/v) ポリペプトン溶液は、分画分子量 3,000 の限外ろ過 (アミコン製) を使用し、室温下でろ過し、ろ過液を使用した。

実験結果

1. 試作品の解析

(1) スターター量の影響

スターターとしての製品を、1%もしくは 10% 使用し、砂糖を 5%用いた場合の生菌数を図 1 に示した。本菌は生育の至適温度が 37~41°C であること⁷⁾および予備実験の結果から、スターターを 10%使用し、37°C, 24 時間での発酵を基本条件と設定した。一方、スターター量が 1/10 となる製品 1%使用の場合は、より長い発酵時間の設定が必要となる。そこで、菌数測定のプレート培養と同様、72 時間⁴⁾発酵としたが、製品中で双方が共生形態で存在するとされる *L. bulgaricus* および *Streptococcus thermophilus* の増殖を可能な限り抑えることを考えた。両菌を用いた発酵乳製造は通常 43°Cで行われており¹⁰⁻¹²⁾, 37°Cへの温度低下は発酵・増殖の遅れをやや生じさせる¹⁰⁾。そこで、さらに温度を低下させるものの、*L. gasseri* SBT2055 株の増殖がプレート培養で事前に確認できている 30°Cで行うこととした。しかし結果として、スターター1%使用の場合は、元のスターターと比較して有意に生菌数が少なかった。スターター10%使用の場合は、他の2種類と比較して有意な差はなかった。

(2) L-アスコルビン酸および単糖類の影響

スターターを 10%, 砂糖を 5%使用し、37°C で 24 時間発酵させた場合で、L-アスコルビン酸を添加したものと、しないものを調べた (図 2)。この両者の間で有意差は認められず、スターターと

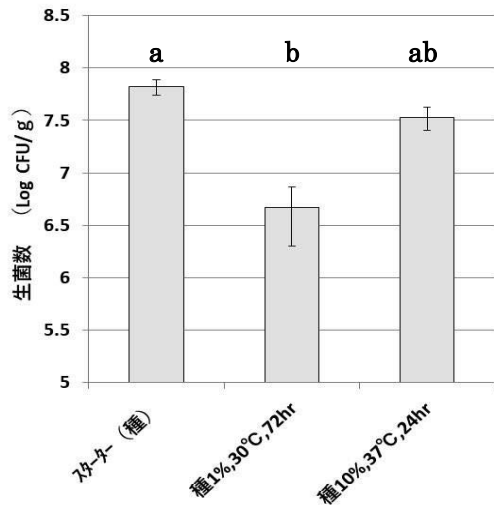


図1. スターター量の影響
異なるアルファベット間で有意差あり。
(n=3, $p < 0.05$)

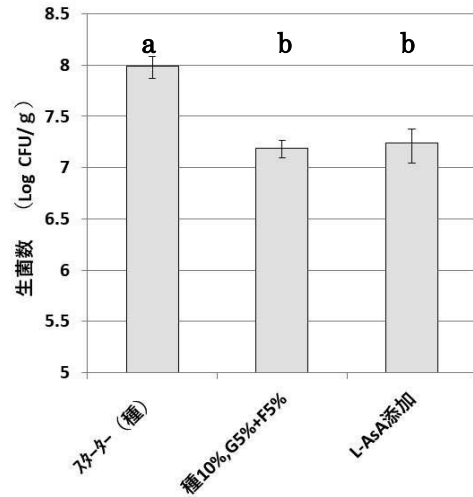


図3. 単糖類の影響
G; グルコース, F; フルクトース
L-AsA; L-アスコルビン酸
異なるアルファベット間で有意差あり。
(n=3, $p < 0.05$)

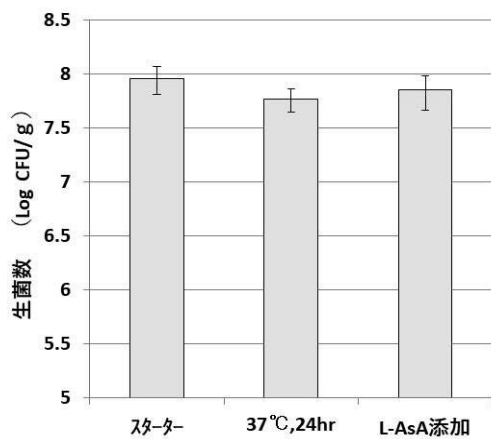


図2. L-アスコルビン酸の影響
L-AsA; L-アスコルビン酸
(n=3, 有意差なし)

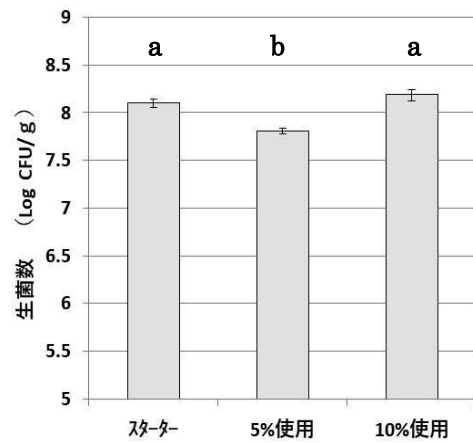


図4. スターターと砂糖の添加量の影響
異なるアルファベット間で有意差あり。
(n=3, $p < 0.05$)

比較しても有意差はなかった。

スターター使用量や温度、発酵時間は上記(図2)とは変えず、砂糖の代わりにグルコースおよびフルクトースを5%使用した場合、およびこれに上記同様L-アスコルビン酸を加えた場合の違いを調べた(図3)。グルコースとフルクトースの併用は、スターター並みの生菌数を示す効果がなく、これへのL-アスコルビン酸の添加効果も認められないことが明らかとなった。

(3) スターターと砂糖の添加量の影響

①スターターの削減(半減)および②砂糖の増

量(2倍)による生菌数の維持・増加が可能かを調べるために、「5%スターター & 5%砂糖(5%使用)」および「10%スターター & 10%砂糖(10%使用)」について調べた(37°C, 24時間発酵)。図4に示されるように、スターターの半減は生菌数の有意な低下を招き、砂糖の増量は生菌数の有意な増大には繋がらなかった。

(4) 食品もしくは試薬の添加の影響

上記の結果から、スターターは10%、砂糖は5%~10%使用することが、スターター並みの生菌数を確保するために必要であることが示された。そ

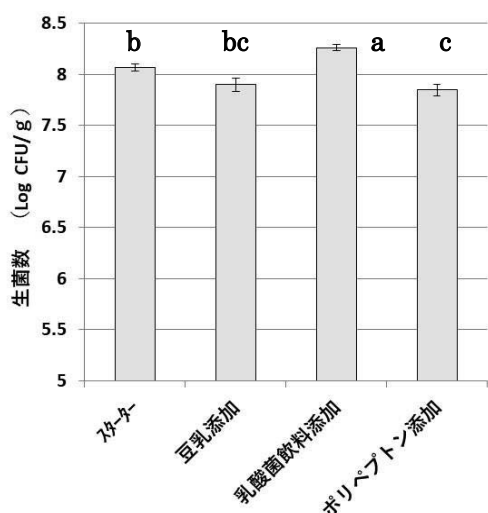


図5. 各種食品添加の影響
異なるアルファベット間で有意差あり。
(n=3, $p < 0.05$)

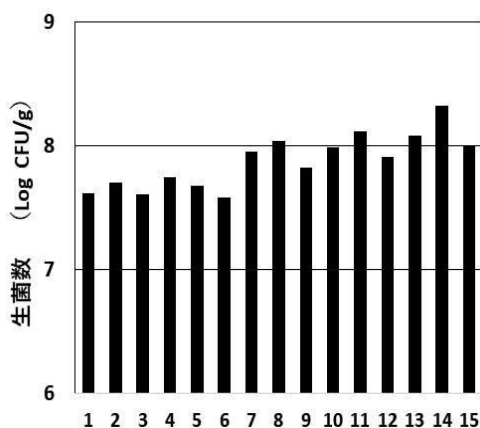


図6. 製造日や購入場所が異なる製品中
での生菌濃度
平均値のみを表示。

こで、図4の結果を基に、スターター10%、砂糖10% (37℃, 24時間) の条件の中で、牛乳の一部を他の食品や試薬溶液に置き換えた場合の効果を調べた。食品として、市販豆乳の低分子量画分もしくは殺菌乳酸菌飲料を、試薬溶液として10%ポリペプトン溶液の低分子量画分を用いた。その結果、スターターと比較して、豆乳は有意差がなく、ポリペプトン溶液は有意に低かった一方で、乳酸菌飲料では生菌数が有意に高かった (図5)。

2. 市販製品の生菌数

本報告では記していないが、上記以外にも様々な実験を行っており、賞味期限や購入店舗の異なる製品を使用してきた。2020年10月から2022年2月までに購入した15品に関して、賞味期限

内に生菌数を測定した結果を古い順に図6に示した。最低菌数は 3.8×10^7 CFU/g (2020年11月製造)、最高菌数は 2.1×10^8 CFU/g (2021年10月製造)、全体平均は 8.5×10^7 CFU/g であった。

考察

雪印メグミルクのガセリ菌 SP 株ヨーグルトは、*L. gasseri* SBT2055 株 (以下、ガセリ菌 SP 株) 以外にも、ブルガリス菌 (*L. bulgaricus*) およびサーモフィラス菌 (*S. thermophilus*) を含む発酵乳である¹³⁾。また、本発酵乳は、乳製品、乳タンパク質、寒天、香料、スクラロース (甘味料) を原材料としている¹³⁾。内臓脂肪を減らす効果を示すガセリ菌 SP 株の増殖に対して、他の乳酸菌の共存が、促進させる効果を有するか明らかにされていない。さらに、原材料として使用している乳タンパク質が何の目的であるのかも公開されていない。今回著者らが行った実験から、スターターとして製品を1%使用した際、ガセリ菌 SP 株は増殖してはいるが、不十分なレベルの生菌濃度しか検出されなかったことから (図1)、使用した牛乳 (雪印メグミルク製) には、最終的にガセリ菌 SP 株の増殖に寄与する栄養源が充分には含まれていないことが推察された。スターターの使用量が5%であっても製品並みには増殖できておらず、少なくとも10%はスターターを使用することが必須であった (図4)。それだけに、製品で使用されている乳タンパク質の中身成分は興味深い。

乳酸菌は通性嫌気性細菌であるが、ガセリ菌 SP 株の生菌数測定では嫌気培養とするよう指定されていることから、培地の酸化還元電位を低下させる作用、すなわち酸素の無い還元的な環境にさせる作用を有する L-アスコルビン酸を添加する実験をおこなったものの、生菌数濃度を高めることはできなかった。また、砂糖 (スクラロース) の代わりにグルコースおよびフルクトースを加える実験も行ったが、生菌数濃度を高めるどころか、むしろ増殖にほとんど寄与していないと解釈される結果となった。L-アスコルビン酸の場合は、ガセリ菌 SP 株の増殖に影響を与えなかったと考えられるが、単糖類の場合には、上述したガセリ菌 SP 株以外の共存する乳酸菌が優先的にこれを利用した可能性が考えられた。

今回の実験の中で、殺菌乳酸菌飲料の添加は、ガセリ菌 SP 株の生菌数濃度を1.6倍ほど有意に高めた (図5)。再実験でも1.5倍高めたことから、ガセリ菌 SP 株とは異なる乳酸菌¹⁴⁾の発酵液を含む殺菌飲料の中に、ガセリ菌 SP 株の増殖をやや促進させる成分が含まれることが示唆され

た。この殺菌乳酸菌飲料の原材料は、牛乳、砂糖、香料および大豆多糖類であるが、大豆多糖類は乳化安定剤としての利用であること、本研究の試作品中に持ち込まれたこの飲料由来の栄養成分としては、最終濃度としてタンパク質が 0.2%、炭水化物が 0.55%にすぎないことから、比較的少量含まれる成分がガセリ菌 SP 株の増殖を促進したことが示唆される。

Arakawa らは、プロバイオティクスとして有益な *L. gasseri* の栄養要求性について調べており¹⁵⁾、この研究を行った目的は、この菌が牛乳中では生育が難しく、食品業界にとって使い勝手が悪いとされている。研究の結果、牛乳由来のタンパク質や遊離アミノ酸ではなく、ペプチド（カゼインの部分分解物）を *L. gasseri* が増殖のために必要としていると結論づけている。著者らの今回の実験で、アミノ酸が豊富なポリペプトンは有効でなかった（図 5）。このポリペプトンはカゼインの酵素分解によって製造されているが¹⁶⁾、ペプチドは多くは含まれていない可能性が示唆された。

スターターを 10% 使用する必要があるものの、製品並みにガセリ菌 SP 株を増やすことができた。また、市販製品は、ラベルに記載の最低保証菌数（1 g 当り 1,000 万個）を大きく上回る生菌数を安定的に保った状態で市場に提供されていることが明らかとなった（図 6）。*L. gasseri* そのものは、経口摂取によって、腸の恒常性の維持、免疫系の調節、アレルギー症状の緩和、細菌およびウイルスの感染予防、感染症症状の緩和に寄与することが報告されている¹⁷⁾。今後も注目され続ける乳酸菌であると思われ、この有用な菌の一層の研究や、学校、職場、家庭での拡大培養のために、今回の著者らの知見が活用されることを期待したい。

文献

- 1) <https://bio.nikkeibp.co.jp/atclyb/21/120200163/> 日経バイオ年鑑 発酵乳市場規模
- 2) Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M. and Tsuchida T.: Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial, *European Journal of Clinical Nutrition*, **64**, 636-643 (2010)
- 3) Toshimitsu T., Gotou A., Sashihara T., Furuichi K., Hachimura S., Shioya N., Suzuki S. and Asami Y.: Ingesting yogurt containing *Lactobacillus plantarum* OLL2712 reduces abdominal fat accumulation and chronic inflammation in overweight adults in a randomized placebo-controlled trial, *Curr. Dev. Nutr.*, **5**(2): nzab006 (2021)
- 4) https://www.meg-snow.com/kinou/d54/pdf/D54_bunsekihoho.pdf 雪印メグミルク ガセリ菌試験方法
- 5) 藤原ひとみ, 上西寛司: ラクトバチルス・ガセリの検出および/または定量用オリゴヌクレオチド, 公開特許公報, 特開 2013-226077 (2013)
- 6) Fujiwara S., Seto Y., Kimura A. and Hashiba H.: Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT 2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism, *Journal of Applied Microbiology*, **90**, 343-352 (2001)
- 7) https://www.meg-snow.com/kinou/e584/pdf/E584_youshiki5.pdf 雪印メグミルク ガセリヨーグルトを科学的に説明する文書
- 8) Xu Y., Hlaing M.M., Glagovskaia O., Augustin M.A. and Terefe N.S.: Fermentation by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains enhances the carotenoid and fibre contents of carrot juice, *Foods*, **9**, 1803 (2020)
- 9) <http://products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/50410H> 各種乳酸菌の酸生成能の説明
- 10) 堀内啓史: ヨーグルトの新製法, 化学と教育 (日本化学会), **55**, 546-549 (2007)
- 11) 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)
- 12) 牧野聖也, 池上秀二, 指原紀宏: NK 細胞活性化剤, 公開特許公報, 特開 2005-194259 (2005)
- 13) <https://www.meg-snow.com/customer/faq/gaseri.html> ガセリ菌 SP 株ヨーグルトの中身の説明
- 14) https://www.asahi-gf.co.jp/company/newsrelease/2015/200503_02/ アサヒグループ食品 カルピス ラクトバチルス ヘルベティカスの説明
- 15) Arakawa K., Matsunaga K., Takihiro S., Moritoki A., Ryuto S., Kawai Y., Masuda T. and Miyamoto T.: *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free

- amino acids, for growth in milk, *Journal of Dairy Science*, **98**, 1593-1603 (2015)
- 16) 田中憲志: 培地の製品化について, *Microbiol. Cult. Coll.*, **23**, 117-121(2007)
- 17) Selle K. and Klaenhammer T.R.: Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health, *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 915-935 (2013)