

学位論文題名

乳業におけるビフィズス菌の利用に関する研究

学位論文内容の要旨

ビフィズス菌は、1899年 Tissier により発見されて以来、人の健康と関わることから多くの研究が行われ、今日では、食品、医薬品、そして酪農飼料など、様々な分野において広く利用されている。その中においても乳業界においては最も古くから開発が進められ、本菌を含んだ乳酸菌飲料、醗酵乳など数多くの製品が開発された。これらの製品の製造に於いては、ビフィズス菌が偏性嫌気性菌であるため、酸素の影響を極力除くことが必要である。しかしながら、工業的規模で種々の乳製品を製造する上で、工程中から酸素を完全に取り除くことは非常に困難であり、ビフィズス菌に対する酸素の影響を無視することはできない。従って、ビフィズス菌を含んだ乳製品を開発するためには、本菌と酸素に関わる問題について根本的に検討を加えなければならない。本研究は上記の問題を解決することを目的とし、ビフィズス菌の酵素に対する挙動について検討を加え、本菌の酸素吸収活性、酸素代謝機構と酸素感受性の関係、酸素毒性緩和物質の検索とそのメカニズム、そして製品中における本菌への酸素の影響とその防御方法について明らかにした。

1 ビフィズス菌の酸素吸収および菌体内多糖類について

Bifidobacterium bifidum (ATCC 15696), *B. infantis* (ATCC 15697), *B. breve* (ATCC 15700), *B. adolescentis* (ATCC 15703), *B. longum* (ATCC 15707), および *B. longum* (BB536) の酸素吸収活性を詳細に検討したところ、供試した全ての菌株において酸素吸収現象が観察された。また、本菌はグルコース等の基質を必要としない内生酸素吸収活性も高く有していた。一方、本菌の菌体内には多量の多糖類が観察された。この多糖類は、酸加水分解したところ殆どグルコースだけを遊離したことから、グリコーゲン類似物質と考えられた。このグリコーゲン様物質を、無糖培地中でのインキュベーションにより消費させて菌体の酸素吸収活性を測定したところ、内生酸素吸収活性の大幅な低下が観察された。これらのことから、ビフィズス菌の示す高い内生酸素吸収は、菌体内貯蔵物質であるグリコーゲン様物質の代謝により起こることが推察された。

2 ビフィズス菌の酸素代謝系と酸素感受性について

B. infantis (ATCC 15697), *B. breve* (ATCC 15700), *B. adolescentis* (ATCC 15703), *B. longum* (ATCC 15707) における酸素感受性と酸素代謝機構について検討した。4 菌株の中で、*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* はほぼ同様な酸素感受性を示し、若干の酸素存在下でも良好な生育を示した。しかし、*B. adolescentis* だけは同じ条件下で生育することができず、他 3 菌種に比べて酸素感受性が高いことが示された。一方、ビフィズス菌は 2 電子還元型の NADH oxidase および NADH peroxidase の両酵素を持ち、分子状酸素を過酸化水素を経て水に還元する酸素代謝機構を持つことが観察された。また、これら両酵素の活性は酸素感受性と対応していた。即ち、酸素感受性の高い *B. adolescentis* はこれらの酵素活性が低く、酸素感受性の低い *B. infantis*, *B. breve*, そして *B. longum* の活性の $1/5 - 1/10$ でしかなかった。これらのことは、ビフィズス菌の持つ NADH-oxidase および NADH peroxidase の両酵素が、本菌に対する酵素毒性を緩和していることを示唆していた。また、superoxide dismutase もビフィズス菌に於いて観察されたが、その活性は非常に低く、また酸素感受性とは関連しないことから、本菌における酸素毒性の緩和にはほとんど寄与していないと考えられた。

3 ビフィズス菌に対する酸素毒性緩和物質およびそのメカニズムについて

B. infantis (ATCC 15697), *B. breve* (ATCC 15700), *B. adolescentis* (ATCC 15703), *B. longum* (ATCC 15707) に対する酸素毒性を緩和する物質およびその作用メカニズムについて検討した。微好気条件下における培養に於いて、培地中にカタラーゼ、鉄イオンあるいはアスコルビン酸ナトリウムを添加することにより成育が改善された。しかしながら、酸素感受性の非常に高い *B. adolescentis* においては、カタラーゼあるいは鉄イオンの効果は認められなかった。カタラーゼあるいは鉄イオンを添加して培養した菌体においては、NADH oxidase および NADH peroxidase の活性が嫌気培養時に比べて 1.5~4.5 倍に上昇し、また嫌気培養時にこれらの物質を添加しても両酵素活性は上昇しなかったことから、これらの酵素は直接的には酸素によって誘導されていると推察され、カタラーゼや鉄イオンは誘導のための 2 次的な役割を果たすと考えられた。更に、鉄イオンを添加した場合、菌体内に嫌気培養時の 3~4 倍の鉄が蓄積された。この鉄分は、無細胞抽出液の分子量 1 万以上の画分に多く認められたことから、細胞内で何等かの物質と結合し、酸素代謝酵素の活性化に影響を与えていると推測された。またアスコルビン酸ナトリウムの添加では、NADH oxidase, NADH peroxidase の両酵素活性は嫌気培養時とはほぼ変わらず、酵素の誘導が行われていなかった。このことは、アスコルビン酸ナトリウムの強力な還元力が、ビフィ

ズス菌に酸素由来のストレスを与えない環境を形成していると推測された。

4 ビフィズス菌の利用における酸素の影響とその対策

B. infantis (ATCC 15697), *B. breve* (ATCC 15700), *B. adolescentis* (ATCC 15703), *B. longum* (ATCC 15707), および *B. longum* (BB 536) について、乳業への利用における酸素の影響を明確にし、その対策を検討した。ビフィズス菌の酵母エキス添加牛乳培地における生育は、酸素の影響が大きい場合は生育の遅れ、又は不能を起こし、その度合は菌株の酸素感受性によって変化した。アスコルビン酸ナトリウムの添加は、酸素感受性の高い *B. adolescentis* の生育を改善したが、*B. longum* に対しては効果がなかった。カタラーゼ、硫酸鉄は両菌株に対して生育改善効果を示した。

ビフィズス菌ヨーグルトの保存中におけるビフィズス菌の生残性に対する酸素の影響を検討し、保存中の酸素がビフィズス菌の生残性に大きく影響することを確認した。このヨーグルトに硫酸鉄、カタラーゼ、アスコルビン酸ナトリウムを添加したところ、特にカタラーゼの添加によりビフィズス菌生残性が大きく改良された。

ビフィズス菌に対する酸素毒性緩和物質として、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼを試験したところ、両物質とも牛乳培地中における生育あるいはヨーグルト中における生残性などに、酸素毒性緩和効果を持つことが示された。ラクトフェリンの効果はその結合鉄によるものであり、ラクトペルオキシダーゼの効果はカタラーゼと同じ作用によるものであることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	斎藤	善一
副査	教授	富田	房男
副査	教授	高橋	興威
副査	助教授	三河	勝彦

本論文は、7章からなり、図29、表25、引用文献75を含む総頁数134の和文論文である。別に参考論文14編が添えられている。

ビフィズス菌は、人間の健康と深く関わることから、食品、医薬品、酪農飼料など様々な分野において広く利用され、乳業界においても本菌を含む数多くの製品が開発されている。しかしながら、偏性嫌気性菌であるため酸素の影響が大きく、ビフィズス菌を含む乳製品を開発するためには、本菌と酸素の関係について知る必要がある。本研究は培養上の問題を解決することを目的とし、ビフィズス菌の酸素に対する挙動について検討を加え、本菌の酸素吸収活性、酸素代謝機構と酸素感受性の関係、酸素毒性緩和物質の検索、そして醗酵乳中における本菌への酸素の影響について明らかにした。

ビフィズス菌として *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 15696), *B. infantis* (ATCC 15697), *B. breve* (ATCC 15700), *B. adolescentis* (ATCC 15703), および *B. longum* 2 菌株 (ATCC 15707, BB 536) を用い、それらの酸素吸収活性を詳細に検討したところ、全ての菌株において酸素吸収現象が観察された。また、本菌はグルコース等の基質を必要としない内生酸素吸収活性も高かった。一方、本菌の菌体内には多量のグリコーゲン様物質と考えられる多糖類が含まれていた。このグリコーゲン様物質の減少により、内生酸素吸収活性の大幅な低下をみたことから、ビフィズス菌の示す内生酸素吸収は、菌体内貯蔵物質であるグリコーゲン様物質の代謝により起こることを推察した。

酸素感受性と酸素代謝機構とについて検討した結果、*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* はほぼ同様な酸素感受性を示したが、*B. adolescentis* だけは他の3菌株に比べて酸素感受性が高いことが観察された。一方、ビフィズス菌は NADH オキシダーゼおよび NADH ペルオキシダーゼを持ち、分子状酸素を過酸化水素を経て水に還元する酸素代謝機構を持つことが示され、これら両酸素の活性が酸素感受性と対応していたことから、両酵素が本菌の酸素毒性防御機構として働いていることを示した。

酸素毒性を緩和する物質およびそのメカニズムについて検討した。培地中へのカタラーゼ、硫酸鉄あるいはアスコルビン酸ナトリウムの添加は酸素毒性緩和効果を示した。微好気条件下でカタラーゼあるいは硫酸鉄を添加して培養した菌体においては、NADH オキシダーゼおよび NADH ペルオキシダーゼの活性が嫌気培養時に比べて1.5~4.5倍に上昇したが、嫌気培養時にこれらの物質を添加しても両酵素活性は上昇しなかった。また、アスコルビン酸ナトリウムの添加によっても、両酵素活性は上昇しなかった。したがって、アスコルビン酸ナトリウムはその還元力により本菌に酸素由来のストレスを与えない環境を形成していると推察した。

B. infantis, *B. breve*, *B. adolescentis*, ならびに *B. longum* について、乳業への利用における酸素の影響を明確にし、その対策を検討した。酸素存在下におけるビフィズス菌の酵母エ

キス添加牛乳培地における生育は、菌株の酸素感受性によって変化した。アスコルビン酸は、酸素感受性の高い *B. adolescentis* の生育を改善したが、*B. longum* に対して効果がなかった。カタラーゼ、硫酸鉄は両菌株に対して生育改善効果を示した。

ビフィズス菌ヨーグルトの保存中において、酸素がビフィズス菌の生残に大きく影響することを確認した。ヨーグルト製造時に硫酸鉄、カタラーゼ、アスコルビン酸ナトリウムを添加したところ、特にカタラーゼの添加によりビフィズス菌生残性が著しく改良された。ラクトフェリン、ラクトペルオキシターゼの添加は、牛乳培地中、およびヨーグルト中におけるビフィズス菌の生育、あるいはヨーグルト中における同菌の生残性を改善し、酸素毒性緩和効果を持つことを明らかにした。

以上の効果成果は、ビフィズス菌の特殊な性質を解明し、醗酵乳等の製造に利用する場合の貴重な知見を示したもので、学術上、また応用の面からも高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者島村誠一は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。