



## ビフィズス菌とその検査法

株式会社ヤクルト本社 中央研究所 園池耕一郎

今回、発酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌数測定用選択培地として開発された「TOS プロピオン酸寒天培地」の必要性、性能等について解説します。

### 1. 乳酸菌・ビフィズス菌と健康

ヒトの腸内には約 100 種類、約 100 兆個、重さにして 100~200g の細菌が生きています。このように多くの種類の細菌が生きている様子を叢(くさむら)に例えて腸内菌叢(腸内フローラ)と呼んでいます。この中にはヒトの健康に良い働きをする菌(善玉菌)や悪い働きをする菌(悪玉菌)がいます。腸内に悪玉菌が多いと腸内腐敗が起こり、便が臭くなったり、発ガン性のある代謝産物が作られたりします。腸内に乳酸菌やビフィズス菌のような善玉菌が多ければ、腸内腐敗は抑えられ、動きの良い健康な腸が維持できると考えられています。

最近、プロバイオティクス(probiotics)という言葉をよく耳にするようになりました。ビフィズス菌や腸管系乳酸菌のようにヒトの健康に積極的に関わって生きている善玉菌のことをプロバイオティクスと呼びます。プレバイオティクス(prebiotics)はこの善玉菌を腸内で増やす機能を持つ食品由来の物質であり、食物繊維やオリゴ糖などがあります。現代人の腸の健康のため、プロバイオティクスやプレバイオティクスの経口摂取が有効と考えられています。

### 2. ビフィズス菌数測定法の必要性

ビフィズス菌の入ったヨーグルトが発売されてからすでに20年以上が経過し、ビフィズス菌数の法的規制あるいは品質保証という面から、簡便で精度の高いビフィズス菌数測定法が強く求められるようになってきました。平成9年、(社)全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会は厚生省(当時)の委嘱を受け、ビフィズス菌検査法検討委員会(委員長:森地敏樹日本大学教授)を設置し、国公立試験機関、大学、在京の乳業メーカー研究所の計13機関、16名の専門家により、はっ酵乳製品中のビフィズス菌数測定法について検討を行いました。2年間の検討の結果、3種類の選択培地を有用と判断しました<sup>1)</sup>。TOS プロピオン酸寒天培地のほか、MGLP 寒天培地と改変 BCP 加プレートカウント寒天培地が選ばれました。

### 3. ビフィズス菌数測定用選択培地

現在、はっ酵乳製品に利用されているビフィズス菌には *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. infantis* があり、組み合わせて使われる乳酸菌には *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* などがあります。このような乳酸菌の中からビフィズス菌を選択的に検出、計数する方法として3つの考え方があります。1つ目は乳酸菌も増殖する培地に抗生物質などの選択剤を添加して乳酸菌のコロニー形成を抑える方法です。MGLP 寒天培地や改変 BCP 加プレートカウント寒天培地がこの方法を応用した培地です。2つ目はビフィズス菌だけが利用できる炭素源を使ってビフィズス菌のみがコロニーを作れるようにする方法で、TOS プロピオン酸寒天培地はこれに当たります。3つ目として、ビフィズス菌が乳酸菌に比べ単純な栄養要求性を持っていることから、栄養源を制限した培地を調製し、ビフィズス菌のみにコロニーを作らせる

方法です。MGLP 寒天培地も TOS プロピオン酸寒天培地も3番目の方法から開発を始められた培地ですが、栄養源を制限した培地で、いろいろな状態にあるビフィズス菌株の全ての増殖を支持するのは困難で、最終的にはそれぞれ1、2の方法の培地として完成しました。

#### 4. TOSプロピオン酸寒天培地の特徴

TOS プロピオン酸寒天培地の組成を表1に示します。TOS プロピオン酸寒天培地に用いられているガラクトオリゴ糖は正確には転移ガラクトオリゴ糖(Transgalactosylated OligoSaccharides)というもので、TOSはその略称です。高濃度のラクトースに $\beta$ -galactosidase(ラクターゼ)を反応させ、転移反応により生成したオリゴ糖を、高純度に濃縮したものです。フラクトオリゴ糖やラフィノースのような他のプレバイオティクス・オリゴ糖が *B. bifidum* に利用されないのに対し、ガラクトオリゴ糖は *B. bifidum* にも利用されます。選択剤としてはプロピオン酸 Na が添加されています。プロピオン酸のような短鎖脂肪酸は、乳酸菌の増殖に対しては阻害効果を持ち、ビフィズス菌に対しては逆に増殖促進効果を持つ有用な選択剤です。

TOS プロピオン酸寒天培地は粉末培地を溶解、滅菌するだけで使用可能で、滅菌済みの培地に、濾過滅菌等をした抗生物質を無菌的に添加するといった面倒な操作を必要としません。

選択剤を応用した培地では、試験製品の保存期間が長くなるとビフィズス菌の検出率が低下する例が多くみられます。酸性状態の製品中に長くおかれたビフィズス菌は細胞障害(acid injury)を受け、選択剤に対する感受性が増すためと思われます。TOS プロピオン酸寒天培地では原理的にこのような欠点がなく、発酵乳・乳酸菌飲料中に乳酸菌と混在するビフィズス菌を簡単な操作で選択的に精度良く検出できます。

#### 5. TOS プロピオン酸寒天培地を用いたビフィズス菌数測定における注意点

TOS プロピオン酸寒天培地の欠点は *L. casei* が小コロニー(ピンポイントコロニー)を作ることですが、ビフィズス菌のコロニーとは容易に判別が可能です(写真1参照)。また *S. thermophilus* の一部菌株がコロニー数は非常に少ないけれども微少なコロニーを作ることがあります。このため、代表的なコロニーの検鏡により、ビフィズス菌であることを形態的に確認することが望ましいと考えます。

TOS プロピオン酸寒天培地は、培地成分に由来する糖分が乳酸菌の炭素源とならないように、使用しているペプトンなどの原材料、添加量を吟味してあります。この結果、TOS プロピオン酸寒天培地は比較的ビタミン、核酸類の乏しい培地となっています。このため、他の培地に比べ**培養時に高い嫌気度を要求**します。このような高い嫌気度は、市販の嫌気培養キット、たとえば BBL のガスパックシステムや三菱ガス化学のアネロパック等の利用で容易に得ることができます。嫌気ジャーを用い、気相置換によって嫌気培養を行う場合は、酸性硫酸銅溶液に浸したスチールウールや使い捨てカイロを入れるなど、残存した酸素を除く処理が必要になります。三菱ガス化学の脱酸素剤エージレスの脱酸素反応は炭酸ガスにより阻害されるので、炭酸ガスで気相置換した嫌気ジャーの脱酸素剤としては使用できません。また、混釈培地として使用する場合、滅菌後、一度固化した培地を再溶解して使用すると検出率が低下する場合がありますので、**培地は用時調製する必要があります**。障害のある細胞が高温の培地と混釈されるとコロニーを作れなくなってしまうことがあります。よって、**混釈時に培地温度を 45℃以下まで冷やす必要があります**。

## 6. ビフィズス菌数測定法の今後の展開

将来、食品の衛生検査法は国際食品規格(codex)が国内法に優先することになると予想されます。現在、国際酪農連盟(IDF)がビフィズス菌数測定法に関する codex 規格案作成のための検討委員会の設置を決定したところで、日本側からは TOS プロピオン酸寒天培地を含めて前記の 3 種類をビフィズス菌数測定用培地として提案する予定です。TOS プロピオン酸寒天培地は、その開発において、想定される多くの条件で満足いく性能を発揮できるよう設計されてきました。今回の粉末培地の市販により、多くの試験研究機関で TOS プロピオン酸寒天培地を利用していただけられるものと思います。今後、種々の課題が生じ、さらに検討、改良を加える必要があるかもしれません。ビフィズス菌数測定法の向上のため、ご使用上お気づきの点を(社)全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会までお知らせいただければ幸いです。

### 参考資料

- 1) (社)全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会:はっ酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌数の測定法(平成12年3月) TEL:03-3267-4686, FAX:03-3267-4663, e-mail:info@nyusankin.or.jp

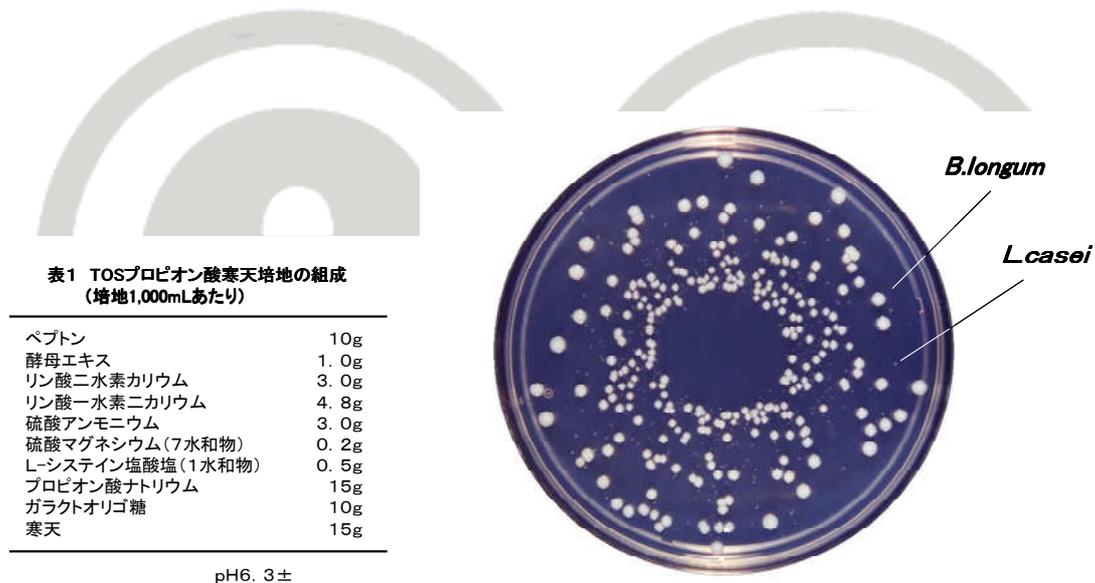


図1 TOSプロピオン酸寒天培地上の*B.longum* ATCC15708と*L.casei* ATCC15708のコロニー径の比較