

プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種の 増殖に及ぼす海藻成分の影響

海老澤 薫^{*1} 本田 杏奈^{*2}
久木 久美子^{*3} 坂井 孝^{*4}

Effect of Aqueous Extracts of Seaweed (*Mozuku*) on the Growth of *Lactobacillus* species in Probiotic Products

Kaoru Ebisawa^{*1} Anna Honda^{*2}
Kumiko Hisaki^{*3} Takashi Sakai^{*4}

Abstract

A seaweed contains components that feed intestinal bacteria, and its relationship with obesity has also been suggested. Recently, probiotic products containing *Lactobacillus* species and prebiotics containing ingredients that feed the *Lactobacillus* have been developed. However, the effect of aqueous extracts of the seaweed on probiotics has not been examined. In this study, we investigated the effect of seaweed (*Mozuku*) extracts on growth of the *Lactobacillus* in probiotics.

As a result, it was shown that the *mozuku* water extract has the effect of growing the *Lactobacillus* contained in the probiotics.

The results of this study suggest that there is a relationship between BMI, frequency of seaweed intake and the gene mutation of β 3ADR, and that this can contribute to the added value of food resources by using seaweed ingredients in probiotic products.

キーワード

seaweed (*Mozuku*), the growth of *Lactobacillus* species, probiotic

* 1 えびさわ かおる：大阪国際大学短期大学部講師（2021. 12. 1 受理）
* 2 ほんだ あんな：大阪国際大学短期大学部非常勤講師
* 3 ひさき くみこ：大阪国際大学短期大学部教授
* 4 さかい たかし：大阪国際大学短期大学部教授

1. はじめに

海藻には陸上植物中には見られないアルギン酸や寒天などの粘稠な水溶性多糖類が大量に含まれており、増粘剤や安定剤などとして広く食品工業的に、また粘膜保護剤など医薬品原料としても利用されている⁽¹⁾。これらの海藻多糖類は陸上植物多糖類セルロースなどと同様に、ヒトの消化管が分泌する消化酵素では分解し難く、食物繊維 (Dietary Fiber) と呼ばれている⁽²⁾。食物繊維は、水溶性食物繊維と不溶性食物繊維に分けられ、いずれも体内には吸収されないため、栄養成分の吸収を阻害する成分⁽³⁾として認識されていた時代があったが、水溶性食物繊維は、小腸での栄養素の吸収の速度を緩やかにし、食後血糖値の上昇抑制、コレステロールを吸着し体外に排出する作用 (血中コレステロール値の低下)、ナトリウム排出促進作用を有し、糖尿病、脂質異常症、高血圧、動脈硬化などの生活習慣病の予防に効果があることが明らかとなっている⁽⁴⁾。一方、不溶性食物繊維は、水分を吸収して便の容積を増やし、大腸を刺激することで排便を促進させる。また、有害物質を吸着させて、便と一緒に体の外に排出するため大腸がんのリスクを軽減する⁽⁵⁾など、多くの研究者によりヒトや小動物に対する食物繊維の有用な機能性が実験的に証明されている。さらに、どちらの食物繊維も大腸内の細菌により分解 (発酵) され、乳酸菌やビフィズス菌などの腸内細菌のエネルギー源となり、その結果腸内環境改善効果が期待されている。

ヒトや動物の腸内には 100 兆、100 種に及ぶ細菌が棲息し大腸内で腸内フローラを形成している。その中でも乳酸菌やビフィズス菌などの腸内細菌は、互いに共生又は拮抗関係を保ちながら、発がん、老化、免疫及び肥満と関連していることが明らかとなっている⁽⁶⁾。

我々は、肥満改善に対する個別化栄養指導法の確立をめざし、これまで遺伝体質及び東洋医学的体質による肥満者の生活習慣等の関係についてデータ収集及び統計学的解析を行ってきた。その結果、 β 3ADR 遺伝子変異を有する肥満と海藻類摂取習慣が関係している可能性を示唆する結果を発表した (日本食育学会議 第 13 回大会 (2018 年 6 月開催))。この結果を裏付ける研究、つまり肥満と海藻類の関係を明らかにすることが、我々の最終目的である遺伝子変異による肥満者の個別化栄養指導のエビデンスを構築することができると考え海藻類に含まれる成分と腸内細菌の関係について着目した。そこで本研究では、まず腸内細菌の代わりに市販プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種を用い、それに含まれる乳酸菌種の増殖に影響する海藻成分の検索を行うことを目的とした。

2. 実験材料と実験方法

(1) 試料

このような培養実験を行う場合、純粋培養された乳酸菌を用いて実験することが主流であるが、今回は、市販の乳酸菌含有プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌を実験に用いた。それぞれに含まれる乳酸菌は、製品 A (*L. casei* YIT9029)、製品 B (*L. paracasei* subsp. *paracasei* NY1301)、製品 C (*L. gasseri* SBT2055)、製品 D (*L. gasseri* OLL2716)、製品 E (*L. bulgaricus* OLL1073R-1) 及び製品 F (*L. helveticus* SBT2171) である (表 1)。また、製品 A と B は乳製品乳酸菌飲料で特定保健用食品として、製品 C、D、E、E 及び

表1 実験に使用したプロバイオティクス製品

製品	種類別	含有乳酸菌種
製品A	乳製品乳酸菌飲料（特定保健用食品）	<i>L. casei</i> YIT9029
製品B	乳製品乳酸菌飲料（特定保健用食品）	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NY1301
製品C	発酵乳（機能性食品）	<i>L. gasseri</i> SBT2055
製品D	発酵乳	<i>L. gasseri</i> OLL2716
製品E	発酵乳	<i>L. bulgaricus</i> OLL1073R-1
製品F	発酵乳（機能性食品）	<i>L. helveticus</i> SBT2171

Fは発酵乳であり、製品C及びFは機能性食品として販売されている。これらの飲料は、いずれの商品も実験当日朝にスーパーで購入したものをを用いた。

今回使用した海藻はもずくである。実験に使用したもずくは、有限会社高木商店より“乾燥もずく”を提供していただいた。“乾燥もずく”は、実験前に食品用ミルを用いて粉末にした。

(2) 方法

乾燥もずく粉末の水溶性抽出物の作成

乾燥もずく粉末の水溶性抽出物（以下、もずく水抽出液）は、乾燥もずく粉末（0.1g、0.5g、1.0g、1.5g）に超純水 50ml（それぞれ水抽出物として、0.2%、1.0%、2.0%及び3.0%）を加えたのち、30分間回転抽出を行った。回転抽出終了後に3,000rpmで20分間遠心分離を行い、その上澄みをもずく水抽出液として実験に供した。なお、予備実験において、もずく水抽出液のろ過滅菌の有無による乳酸菌種の増殖への影響を確認したところ、ろ過滅菌したもずく水抽出液は増殖作用を有さず、一方において、ろ過滅菌なしのもずく水抽出液は乳酸菌種の増加作用を有することを確認したため（図1）、今回の実験では、もずく水抽出液はろ過滅菌なしのものを使用した。また、データには示していないが、温水（60℃）でも抽出を試みた結果、水抽出と同じ傾向を示したため、今回の実験においては水で抽出する方法を採用した。

市販プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種の培養

乳酸菌種の培養には、乳酸菌数測定用のBCP加プレートカウント寒天培地‘栄研’（以下、BCP加培地と示す、組成：培地1,000mlあたり酵母エキス2.5g、ペプトン5.0g、ブドウ糖1.0g、ポリソルベート80 1.0g、L-システイン塩酸塩0.1g、プロムクレゾールパープル0.04g、カンテン15.0g、pH6.9 ± 0.2）（栄研化学株式会社）を用いた。所定の用法（24.6g

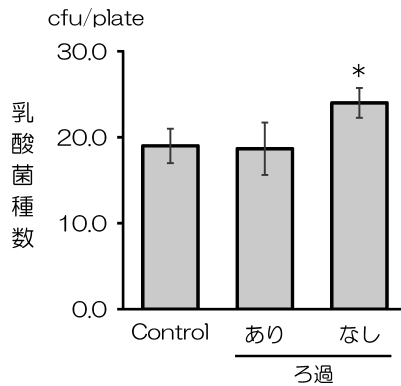


図1 もずく水抽出液のろ過操作の有無と乳酸菌種の増殖

データは平均値±標準偏差で示した (n=3)

*: $p < 0.05$ vs. Control

に対し精製水 1,000ml) により調整した BCP 加培地はオートクレーブを用いて 121℃で 15 分間の加圧滅菌を行った。

BCP 培地 15ml に対し、適宜希釈した乳酸菌種液 0.2mL、もずく水抽出液 1.0mL を加え混釈平板培地を作成した。なお、コントロールとして、もずく水抽出液の代わりに滅菌超純水 1.0mL を加えた。混釈平板培地は、35～37℃で 48 時間（一部 72 時間）培養し、乳酸菌種数を計測した。

統計解析

得られたデータから平均値±標準偏差を求めた。統計解析にはエクセル統計 Ver.3.22 (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いた。乳酸菌種の培養に用いたもずく水抽出液に関するろ過操作の有無に関しては、一元分散分析後 Dunnett 法による解析を行った。また、製品 A に含まれる乳酸菌種の増殖ともずく水抽出液濃度との関係については、一元分散分析を実施後 Bonferroni の方法を用いて解析を行った。さらに、製品 B、製品 C、製品 D 及び製品 E における菌数の変化については、等分散性の検定 (両側) を行い、等分散性が確認された場合は student's t-test、等分散性が確認されなかった場合は welch の方法により母平均の差の検定をおこない、 p 値及び 95% 信頼区間を求めた。なお、すべての統計解析には、危険率 5% 未満を有意差ありと判断した。

3. 結果

製品 A に含まれる乳酸菌種の増殖に及ぼすもずく水抽出液の影響について検討した結果を図 2 に示した。製品 A に含まれる乳酸菌種は、0.2% もずく水抽出液添加ではコントロールと比較し増殖していたものの有意性は認められなかった。濃度が 1.0% 以上のもずく水抽出液を添加するとコントロールより有意に増加した。しかしながら、もずく水抽出液の濃度が 3.0% では 2.0% の菌数とほぼ同レベルであった。製品 A についてももずく水抽出液添加で増殖効果を認められたため、製品 B～F についても 1.0% もずく水抽出液を添加して、そ

プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種の増殖に及ぼす海藻成分の影響

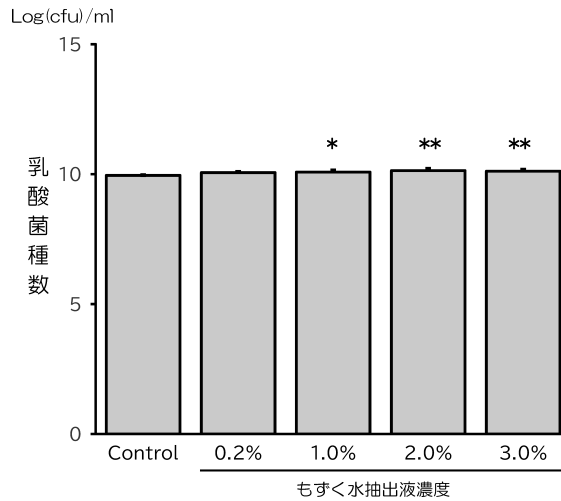


図2 製品Aに含まれる乳酸菌種の増殖に及ぼすもずく水抽出液濃度の影響

データは平均値±標準偏差で示した (n=6)

*: $p < 0.01$ vs. Control **: $p < 0.001$ vs. Control

の増殖への影響を確認した。その結果を表2に示した。結果はコントロールの菌数を基準(1とした)として、1.0%もずく水抽出液添加時の菌数を倍数で示した。この結果から有意に増加した製品(B、D、E、及びF)に含まれる菌種及び有意性はないが増加した製品(C)に含まれる菌種があることが分かった。いずれにしても、製品Aに含まれる菌種を含めて今回実験に供した市販プロバイオティクス製品に含まれる菌種について、一定濃度のもずく水抽出液に増殖効果が認められた。

表2 ドリンクタイプの市販プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種の増殖効果

製品	Control	もずく水抽出液*	p値	母平均の差の95%信頼区間	
				下限	上限
製品B	1	3.10	<0.001	24.1817	47.1516
製品C	1	1.33	0.109	-11.2425	76.5759
製品D	1	2.21	0.002	14.2351	31.0982
製品E	1	4.39	<0.001	43.3735	67.2932
製品F	1	1.80	0.012	4.5685	21.4315

* ; 48時間培養後のControlの菌数の平均値を1として、1.0%もずく水抽出液添加時の菌数の平均値を倍数で表した

4. 考察

本実験は、腸内細菌の善玉菌である乳酸菌を含むプロバイオティクスを用いて、もずく水抽出液に含まれる成分の乳酸菌増殖作用の有無について検討した。

プロバイオティクスは、1989年 Fuller⁽⁷⁾により「腸内常在菌のバランスを変えることにより宿主に保健効果を示す生きた微生物」として定義された。その後、Salminen ら⁽⁸⁾により、「宿主に保健効果を示す生きた微生物、またはそれを含む食品」として再定義された。現在の我が国においては、乳酸菌やビフィズス菌などを含む数多くのプロバイオティクス製品が開発・販売されている。

一方、海藻類には酸性多糖類であるフコイダンやアルギン酸が多く含まれており、腸内生態系または微生物叢を調節するプレバイオティクスとして注目されている⁽⁹⁾。フコイダンは、酸性多糖類の一つで、抗肥満作用、抗凝固作用及び抗酸化作用を有する報告⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾があり、海藻類の中でも「もずく」、特に沖縄産のものに多く含まれている。また、海藻成分のぬめりの主成分であるアルギン酸は、フコイダン同様酸性多糖類であり、ナトリウム排泄促進による血圧上昇抑制などの薬理作用⁽¹²⁾のほか、低エネルギーによる抗肥満作用や整腸作用等が報告⁽¹³⁾されている。もずくには生理作用を有する成分が多く含まれているが、今回我々が示した結果について、もずく水抽出物に含まれる成分の同定をおこなっていないため、一番関係性の強いフコイダンやアルギン酸が関連しているのかは不明である。今後詳細な分析が必要であるが、少なくとも乳酸菌種の増殖に関与する成分が含まれていることは確かである。

今回の我々の結果(図1)において、ろ過滅菌による増殖効果がなくなった。ろ過滅菌には通常0.22 μmのフィルターが使用される。今回我々も同様に0.22 μmのフィルターを用いた。この径のフィルターはバクテリアやカビ、酵母などは通さないため、試薬中からこれらの物質を除去でき、培養で使用する培地(一部はオートクレーブ可)や血清など熱により変性するものの滅菌法としてよく使用されている。今回我々は、もずく水抽出液に含まれる物質がオートクレーブ処理により変性することを避けるために、ろ過滅菌の手法を採用した。フコイダンやアルギン酸のような多糖類はフィルターを通過すると考えられ、今回の増殖因子がフコイダンやアルギン酸であればろ過滅菌しても増殖効果が残るはずである。しかしながら、ろ過滅菌作業により乳酸菌種の増殖効果がなくなったことから、今回の実験において乳酸菌種の増殖はフコイダンやアルギン酸による作用でない可能性が考えられる。この点からも、今後もずく水抽出液に含まれる成分を同定することが必要であると考える。

一方、乳酸菌種について、本来このような培養実験を行う場合、純粹培養された研究用に保管された乳酸菌を用いて実験することが主流であるが、我々は食品に含まれる乳酸菌種を用いて実験を行った。その理由としては、我々は日常様々なものを摂取し、色々な成分が相互作用することで、体内で様々な作用を発揮する。可能な限り日常生活を反映させられるような状況で、その影響を確認することに焦点を当てた。今回の想定は食事にもずくを食べ、食後に乳酸菌飲料などの乳製品を摂取して、消化器管内でもずくの水性成分と乳製品の乳酸菌が混合されるという想定である。今回6種類のプロバイオティクス製品

(乳酸菌が6種類)を用いて実験を行ったが、もずく水抽出液の効果が菌種により若干異なった。これは、乳酸菌種の違いも一因であると考えられるが、プロバイオティクス製品に含まれる他の成分によるものや、製品自体の販売までの流通なども関与していると考えられる。しかしながら、今回の結果は、既存のプロバイオティクス製品に対し、海藻成分を付加した新たな製品(シンバイオティクス製品)の開発に貢献するのではないかと期待できる。

今後、今回の結果に基づく再検証実験を行うとともに、その他の海藻(わかめなど)の乳酸菌増殖効果やビフィズス菌に対する作用について検討する予定である。

5. まとめ

本研究では、市販プロバイオティクス製品に含まれる乳酸菌種の増殖に及ぼすもずく水抽出液添加の影響について検討した。その結果、もずく水抽出液に含まれる成分には、市販のドリンクタイプ乳製品乳飲料や発酵乳に含まれる乳酸菌種を増殖させる作用を有することが示唆された。このことは、我々の目指している研究課題(β 3ADR 遺伝子変異による肥満者は海藻摂取頻度が少ない?)のエビデンスの一つとして活用することができ、また、市販のプロバイオティクス製品に対し、海藻成分を利用した食資源の付加価値の向上にも貢献できるものと考えられる。

6. 謝辞

本研究の一部は、2019年及び2020年度大阪国際大学学術研究助成特別研究費(整理番号3及び整理番号9)により実施した。

7. 参考文献

- (1) T. Nishimune, T. Sumimoto, T. Yakusiji, N. Kunita, T. Ichikawa, M. Doguchi, and S. Nakahara: Determination of total dietary fiber in Japanese foods., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, pp350-359 (1991)
- (2) H. Trowell: Food and dietary fiber., *Nutri. Rev.*, 35, pp6-11 (1977)
- (3) 印南 敏:食物繊維の定義と用語、「食物繊維」(印南 敏、桐山修八編)、第一出版、東京 (1982)
- (4) K. Nishizawa, M. Ohno: The Chemical Structure and Pharmaceutical Functions on Water-Soluble Dietary Fibers of Seaweeds, *JOURNAL OF JAPANESE ASSOCIATION FOR DIETARY FIBER RESEARCH*, vol.8 No.1, pp1-12 (2004)
- (5) 辻啓介:食物繊維とその機能、食生活総合研究会誌、vol.3 No.1, pp26-30 (1992)
- (6) 光岡知足 腸内フローラとその機能、食品衛生学雑誌、36巻5号、pp583-587 (1995)
- (7) Fuller R.: Probiotics in man and animals., *J. Appl. Bacteriol.*, vol.66, pp365-378 (1989)
- (8) Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C., *et al.*: Functional food science and gastrointestinal physiology and function., *Br. J. Nutr.*, vol.80, S147-171 (1998)
- (9) Chen, Q., Liu M., Zhang P., Fan S., Huang J., *et al.*: Fucoidan and galacto-oligosaccharides ameliorate high-fat diet-induced dyslipidemia in rats by modulating the gut microbiota and bile acid metabolism, *Nutrition*, vol.65, pp50-59 (2019)
- (10) T. Yokota, K. Nomura, M. Nagashima, and N. Kamimura: Fucoidan alleviates high-fat diet-

国際研究論叢

- induced dyslipidemia and atherosclerosis in ApoE (shl) mice deficient in apolipoprotein E expression., *J. Nutr. Biochem.*, vol.32, pp46-54 (2016)
- (11) 韓 立坤、具志堅健作、奥田拓道：沖縄産モズク由来のフコイダンの抗肥満作用について、日本体質医学会雑誌、vol.66 (1/2), pp55-60 (2004)
- (12) 辻 啓介、辻 悦子、中川靖枝、鈴木慎次郎：食物繊維のナトリウム吸着能が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響、日本家政学雑誌、vol.39 No.3, pp187-195 (1988)
- (13) 大石圭一編：海藻の科学、朝倉書店 (1993)