

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12741

研究課題名(和文)人工透析患者向けプロバイオティックドリンクヨーグルトの創製

研究課題名(英文)Creation of probiotic drink yoghurt for artificial dialysis patients

研究代表者

増田 哲也(MASUDA, Tetsuya)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60165719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工透析患者向けプロバイオティックドリンクヨーグルトの創製を目指し、2年間検討した結果、全乳をタンジェンシャルフロー方式で限外ろ過しカリウム等のミネラルを低減したものに、市販のDVIスターターとL.gasseri JCM1025を添加して37℃で7時間培養することが最適であると確認された。培養後に4℃の冷蔵庫に保存し経時的にプロバイオティック効果が期待されるL.gasseri菌数を測定したところ、2週間後までは培養直後とほぼ同数の菌数を維持していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：I studied for 2 years aiming at creation of probiotic drink yoghurt for artificial dialysis patients. As a result, the whole milk obtained by reducing the minerals such as potassium by the tangential flow method was optimal for the raw material of yoghurt. Yoghurt was prepared by adding commercially available DVI starter and L. gasseri JCM 1025 expected to have a probiotic effect to this raw milk and culturing at 37 ° C. for 7 hours. The yogurt was stored in a refrigerator at 4 ° C. and the number of L. gasseri bacteria was continuously measured. As a result, it was confirmed to maintain the same number of bacteria as immediately after culturing up to 2 weeks.

研究分野：酪農化学

キーワード：医療用食品 人工透析患者向け乳製品 低カリウム乳製品 プロバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

日本には32万人ほどの人工透析患者がいると言われて¹⁾。人工透析患者は腎機能が低下しているため、尿中に排泄されるミネラルの制限が存在し、特に生命維持のため、カリウムの制限が極めて重要である²⁾。カリウムの摂取量を超えると、四肢の重みなどを覚え、重い場合は致死的な不整脈を起すこともある^{2,3)}。また、リンの摂取量を超えると、カルシウムと結合したリン酸カルシウムが関節などに沈着することによって痛みを引き起こすことや、血管などに沈着することにより、血管系の石灰化を促進し、心筋梗塞などを引き起こすこともある³⁾。

牛乳は高カリウム・高リン食品の一つである³⁾が、必須アミノ酸を充足する高いアミノ酸スコアや、高いカルシウム吸収効率などの多くの長所が存在し⁴⁾、人工透析患者が引き起こしがちな、低栄養や、低Ca血症など^{2,3)}に対して有用な部分も多いと考えられる。

また、人工透析患者は、カリウム制限などのために繊維分の多い野菜などの摂取制限や薬の副作用などによって、便秘の頻度が高い⁴⁾。

2. 研究の目的

高カリウム・高リン食品の一つである牛乳は、必須アミノ酸を充足する高いアミノ酸スコアや、高いカルシウム吸収効率などの多くの長所が存在し⁵⁾、人工透析患者が引き起こしがちな、低栄養や低Ca血症など^{2,3)}に対して有用な部分も多いと考えられる。

さらに、人工透析患者の多くは、繊維分の多い野菜を摂取することに対する制限や薬の副作用などによって、便秘に苦しんでいる⁴⁾。

そこで、カリウムを低減した脱脂乳(以後、低カリ脱脂乳)に胃酸・胆汁酸耐性および便

通改善効果を持つ乳酸菌を添加した発酵乳を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低カリ脱脂乳の調製法

初年度は、15%脱脂乳を分画分子量10kDaの限外ろ過膜(ウルトラフィルター:東洋濾紙株式会社)をセットしたデッドエンドフロー方式(DEF方式)の限外ろ過器(ウルトラフィルター用限外ろ過器;東洋濾紙株式会社)で、窒素ガスを3.1kg/cm²の条件で通気し19時間加圧して限外ろ過した。19時間後に、ろ液と同量の蒸留水を限外ろ過器内に残った脱脂乳に加え、もとの量に戻して低カリ脱脂乳を調製した。

次年度は、より高いろ過速度と大量の処理が可能なタンジェンシャルフローろ過方式(以下TFF方式)のKrosFlo Reserch i タンジェンシャルフローろ過システム(Spectrum Laboratories, Inc.)に中空糸膜(D02-E005-10-N)を装着して、せん断流速が4000/secとなるように、283mL/minの流速でポンプを作動させて低カリ脱脂乳を調製した。なお、ろ過が進行すると、限外ろ過器の供給側の圧力が上昇したため、ろ液と同量の蒸留水をろ過前の脱脂乳に加えた。

(2) 低カリ脱脂乳の組成

カリウム含量はカリウムイオンメーター(コンパクトカリウムイオンメーターB-731, 堀場製作所)で、カルシウム含量は、調製した低カリ脱脂乳のpHを4.3~4.6に調整したのち蒸留水で10倍に希釈し、カルシウムイオンメーター(コンパクトカルシウムイオンメーターB-751, 堀場製作所)で測定した。乳糖含量は酵素法(F-キット:株式会社J.K.インターナショナル)で測定した。また、遊離リン含量はモリブデン酸アンモニウムによるリン定量法で除タンパク画分について

測定した。

(3) 低カリウムヨーグルトの調製

DEF方式で調製した低カリ脱脂乳より試験的にヨーグルトを調製した際には、限外ろ過により減少した乳糖を補填し、市販のDVIスターターを用い37℃で培養した。さらに、限外ろ過した脱脂乳から調製したヨーグルトは保形性が不十分なので寒天・ペクチンの最適添加量を検討した。次にDVIスターターと同時に胃酸耐性、胆汁酸耐性に優れ便通改善効果も確認された *Lactobacillus gasseri* JCM1025 を2%量添加してヨーグルトを作製した。

TFF方式で調製した低カリ脱脂乳を原料として *L. gasseri* JCM1025 含有ヨーグルトを調製した。さらに、全乳をTFF方式で処理し、それを原料にしたヨーグルトを作製した。

(4) 低カリヨーグルトの理化学的ならびに微生物学的性状

カードテンションおよび離水率

カードテンションは、完成したヨーグルトをカードテンションメーター（富士理化学工業株式会社）で測定した。離水率は重量既知のヨーグルトを遠心分離（640×g・4分・10分）し、分離した液体の重さを量り取り、全体の重量に対する割合で示した。

乳糖・カリウム・カルシウム含量

乳糖含量は前述の酵素法で、カリウムとカルシウム含量はイオンメーターで測定した。

アセトアルデヒド等のカルボニル化合物生成量

試作したヨーグルトより75%エタノール可溶性画分を調製し、DNPH反応液を作用させたものをODSカラムで分析（溶離液：50%アセトニトリルを1.5ml/min，検出波長：365nm，カラム温度：40℃）した。

全乳酸菌数および *L. gasseri* JCM1025 菌数

試作したヨーグルトの全乳酸菌数はBCP加プレートカウントアガールで37℃，72時間培養し、*L. gasseri* 菌数は酸性マルトースMRS培地で37℃，96時間培養して菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 低カリ脱脂乳の調製法

表1に示したように、DEF方式でもカリウム含量を初発の1/4量まで低減可能であることを確認した。しかし70mlの15%脱脂乳を処理するのに19時間を要した。さらに限外ろ過膜が目詰まりを起こしたため途中で交換する場合もあった。

表1 デッドフロー方式で調製した低カリ脱脂乳の性状

	ろ過前	ろ過後	ヨーグルト作製後
pH	6.51	6.84	5.02
乳糖含量	75.40g/L	57.11g/L	43.93g/L
カリウムイオン濃度	2500mg/L	577mg/L	620mg/L
カルシウムイオン濃度	85mg/L	42mg/L	540mg/L
離水率	-	-	55%
カードテンション	-	-	19.67

TFF方式での低カリ脱脂乳の調製（表2参照）は、DEF方式でのカリウム低減と同程度までに要する時間を大幅な時間の短縮（19時間→2時間）を可能にした。

表2 TFF方式により調製した低カリ脱脂乳の性状

カリウム (mg/L)		カルシウム (mg/L)		乳糖 (g/L)	
ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後	ろ過前	ろ過後
1900	520	1500	1500	-	12.37

さらに、運転開始から30分ごとにろ液と等量の蒸留水を原料脱脂乳に加えることで、圧力の上昇を回避でき、しかもろ過時間の短縮（200mlの原料脱脂乳のろ過時間を136分から91分に）が可能となった。

(2) 低カリヨーグルトの調製

DEF方式で調製した脱脂乳を95℃で15分の条件で殺菌したのち、DVIスターターを添加して37℃で11時間培養したが、pHは5.02までしか低下しなかった。

さらに、市販品のヨーグルトの場合、40g前後であるカードテンションが19.7gであった。また、市販品の場合、5%以下が望ましいとされている離水率も55%と著しく高いものであった。

そこで、ペクチン、寒天を添加して物理的性状の改善を検討したところ、ペクチンを0.2%量と寒天を0.1%量の割合で添加することで対応可能であることが確認された。

この低カリ脱脂乳に *L. gasseri* JCM1025 の培養菌液を2%量添加し37℃で培養したところ、7時間でpHが4.6となった。離水率は8.1%とまだ理想値より高いものの、このヨーグルトにも0.2%量のペクチンと0.1%量の寒天を添加しているため、カードテンションは約38gであり、保形性のあるヨーグルトが調製できることが確認された。

一方、TFF方式により調製した低カリ脱脂

乳の場合は、ペクチンと寒天を添加しなくても十分な物理的性状を維持できることが確認されたので、*L. gasseri* JCM1025 の培養菌液を 2%量添加し 37 で培養してヨーグルトを調製した。その結果、3 回の試行でカードテンションは平均 39.01g と非常に良好な値であったが、離水率は 18%と予想外に高い値となってしまった。

そこで、乳脂肪が存在するヨーグルトは、風味の改善や、離水率の低下などが期待できるとの報告もあるので、全乳を TFF 方式で処理したもの（表 3 に組成表示）を原料とし低カリヨーグルトを調製した。

表 3 全乳を TFF 方式で濾過した際のろ過乳の組成

	カリウムイオン (mg/L)	カルシウムイオン (mg/L)	乳糖 (g/L)	遊離リン (mg/100mL)
ろ過前	1500	89.33	44.02	33.42
ろ過後	533.33	68.67	16.81	29.34
ろ液	756.67	70.33	23.58	31.79
発酵後	643.33	-	37.92	28.10

全乳のろ過を行ったが、ろ過中に目詰まりや、急激な圧力の上昇はなく、表 3 に示したようにカリウム含量を目標値である 600mg/L 前後まで低減可能であることが確認された。

ろ過前後の各種成分の変動についても、全乳と脱脂乳の成分の差はあるが、限外ろ過前後の脱脂乳の成分変動と同程度であった。

さらに、この限外ろ過全乳を原料として試作した *L. gasseri* 含有ヨーグルトの物理的性状は表 4 に示したように、離水率も 5%以下となり市販品と遜色ないものとなった。

表 4 限外ろ過全乳より調製した低カリヨーグルトの物理的性状

	離水率	カードテンション(g)
1 回目	5.13%	38.43
2 回目	4.16%	37.47
3 回目	5.00%	35.11
平均値	4.76%	37.00

(3) 低カリヨーグルトの理化学的ならびに微生物学的性状

アセトアルデヒド含量
ヨーグルトのアセトアルデヒド含量の理想

値は 5~20.7ppm の範囲とされているが、DEF 方式で調製した低カリ脱脂乳を原料として試作したヨーグルトの場合は 2.49ppm と著しく低いものであった。TFF 方式で調製した低カリ脱脂乳を原料としたヨーグルトのアセトアルデヒド量は 7.66ppm と改善したが、全乳より調製した低カリヨーグルトでも 7.63ppm と期待したほどの増加は認められなかった。

微生物学的性状

DEF 方式で調製した低カリヨーグルトの全乳酸菌数は 2.6×10^8 cfu/ml で、酸性マルトース MRS 培地で測定した *L. gasseri* 生菌数は 3.2×10^7 cfu/ml となった。

さらに、完成したヨーグルトを 4 で 3 週間冷蔵し、経時的に全乳酸菌数と *L. gasseri* 生菌数を測定したところ、3 週間目に *L. gasseri* 生菌数が減少した。

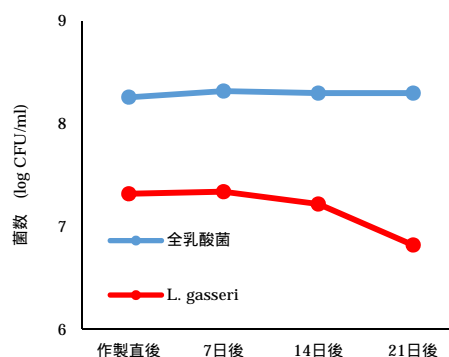


図 1. 冷蔵下での低カリヨーグルトにおける全乳酸菌数と *L. gasseri* 菌数の経時的变化

全乳を TFF 方式で限外ろ過したものを原料とし、*L. gasseri* を添加したヨーグルトを上述と同条件で冷蔵した際の全乳酸菌数および *L. gasseri* 菌数の経時的变化を図 2. に示した。

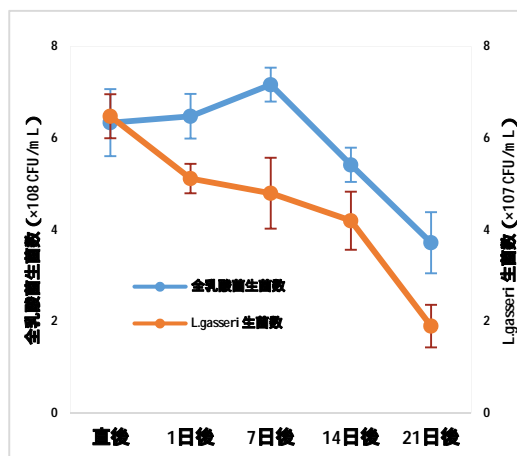


図 2. 冷蔵下での低カリヨーグルト(全乳: TFF 方式)の全乳酸菌数と *L. gasseri* 菌数の経時的变化

2週間後でも全乳酸菌数は乳等省令に定められている発酵乳の規格である 10^7 CFU/mL以上を維持し、*L.gasseri*の生菌数も機能性を発揮するのに必要な 10^7 CFU/mL⁵⁾以上を維持していた。しかし、21日後で生菌数は急激に低下し、*L.gasseri*生菌数は基準に近い値まで低下してしまっていたため、機能性を維持することのできる期限としては、14日~21日程度であると判断した。

(4) まとめ

人工透析患者向けプロバイオティックドリンクヨーグルトの創製を目指し、2年間検討した結果、全乳をTFF方式で限外ろ過しカリウム等のミネラルを低減したものに、市販のDVIスターターと*L.gasseri*JCM1025を添加して37℃で7時間培養することが最適であると確認された。培養後に4℃の冷蔵庫に保存し経時的にプロバイオティック効果が期待される*L.gasseri*菌数を測定したところ、2週間後までは培養直後とほぼ同数の菌数を維持していることが確認された。

<引用文献>

- 1) 「図説 わが国の慢性透析療法の現況」, 一般社団法人 日本透析医学会統計調査委員会.
- 2) 篠田俊雄・峰島三千男(2011), 「透析のすべて-原理・技術・臨床-」, 学研メディカル秀潤社, 東京, pp211-212, p368.
- 3) 信楽園病院腎センター 編 (2010), 「透析療法マニュアル」, 日本メディカルセンター, 東京, pp346-348, pp424-427.
- 4) 西原舞・平田純生・和泉智・古久保拓・太田美由希・藤田みのり・山川智之・田中一彦 著 (2004), 「透析患者の便秘症についての実態調査」, 透析会誌, 37(10), pp1887-1892.
- 5) 上野川修一編(2009), 「ミルクの事典」, 朝倉書店, 東京, pp430-431, pp133-134.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 哲也 (MASUDA, Tetsuya)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 60165719