

氏 名(本籍) ゆ 湧 ぐち 口 ひろ 浩 や 也

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 3 5 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 2 月 9 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 ビフィドバクテリウム属細菌を利用した  
ヨーグルトの開発に関する基礎的研究

論 文 審 査 委 員 (主 査)

教 授 足 立 達 教 授 勝 野 正 則

助 教 授 伊 藤 敏 敏

# 論文内容要旨

## 第一章 緒論

発酵乳は紀元前数世紀より人々に受けつがれてきた伝統的な食品であり、かつ昔から健康に良い食品として認められてきた。中でもヨーグルトは20世紀の初頭Hetchnikoff が「長寿説」を発表して以来、世界的に普及した。ヨーグルトの研究および変遷は細菌学の研究の進歩と深くかかわっている。

1957年、Haeneal が成人の腸内の有用最優勢菌がビフィドバクテリウム属細菌であることを明らかにして以来、1968年にSchuler らがビフィドバクテリウム属細菌を利用したヨーグルトのBiogardeを調製し、世界中に関心をもたれるようになった。それ以来、国内外においてビフィドバクテリウム属細菌を利用した多くのヨーグルトが市販されるようになった。しかしながら、これらの製品には、風味、組織およびビフィドバクテリウム属細菌のヨーグルト中での生菌数の大幅な減少など多くの問題点を残していた。その後、ビフィドバクテリウム属細菌の生理学的作用と人間の健康との関わりが明らかになるに伴い、ビフィドバクテリウム属細菌を利用した食品が最も保健効果のある食品の一つとして推奨されている。

そこで、ビフィドバクテリウム属細菌の高い菌数レベルを維持し、酸味を抑え、風味および組織の優れた新しいタイプのアレインヨーグルトを、ビフィドバクテリウム属細菌と他の乳酸菌との組合わせて調製できれば、健康に良く、嗜好性にも富んだ基本的な応用範囲の広い製品が開発できると考えられる。本研究は、このような製品を開発するために必要な基本的な諸条件の確立を目的として検討を行なわれたものである。

## 第二章 ヨーグルト中におけるビフィドバクテリウム属細菌の生残性におよぼす要因解析

ビフィドバクテリウム属細菌の5菌種および併用乳酸菌6菌種を用いてヨーグルトを調製し、保存後のヨーグルト中のビフィドバクテリウム属細菌の菌数を測定し生残率を求めた。その結果、ヨーグルト中におけるビフィドバクテリウム属細菌の生残性は菌種により異なり、ビフィドバクテリウム属細菌*B. longum*が一番高く (Table 1)、また、併用乳酸菌では*L. acidophilus*、*Str. thermophilus*、が高く、*L. bulgaricus*は低かった。しかしながら、ヨーグルトの風味や組織的には、*L. acidophilus*を使用するよりも*L. bulgaricus*および*Str. thermophilus*を使用したものが優れていた。そこで、ヨーグルトの培養中および保存中に生成される酸素を吸収する方法として、*Str. thermophilus*の酸素吸収能の高い菌株*Str. thermophilus* SH-8205 等の4菌株を見出だし (微工研菌寄第6777~6780、Table 1)、この菌株を利用することにより、通常の*Str. thermophilus*を使用したものよりもビフィドバクテリウム属細菌の生残性が顕著に高くなることを明らかにした (Table 2)。さらに*L. bulgaricus*と*Str. thermophilus*の菌数比を共生する範囲内 (1:40) で*Str. thermophilus*を高めることにより、ビフィドバクテリウム属細菌の生残性が高くなることを明らかにした (Table 2)。

実際の製造では、ビフィドバクテリウム属細菌のスターター (液体および凍結濃縮カルチャー) 保存温度および期間等の管理、培養終了PHの管理、容器素材 (酸素透過性) の選択およびフルーツの使用

用方法が重要であり、それらの要因がヨーグルト中におけるビフィドバクテリウム属細菌の生残性におよぼす影響を明らかにした。

### 第三章 ヨーグルト中におけるビフィドバクテリウム属細菌を増殖させるための新規生育促進物質源の開発

ビフィドバクテリウム属細菌のスターターの活性や培養工程中の生育が活発であれば、高い生菌数が確保でき、生残性の優れたヨーグルトが得られ、また併用乳酸菌の生育との関連で培養のコントロールや風味の調製が容易となる利点がある。そこで、食品の安全性および風味をも考慮して天然物由来の新規生育促進物質源の開発を行なった。その結果、日本近海産の小鯖の全魚体を、*Bacillus polymyxa*の生産するプロテアーゼで分解して調製した、窒素化合物80.9%の魚肉分解物の粉末を得た。この粉末の*Str. thermophilus*、*L. bulgaricus*およびビフィドバクテリウム属細菌の生育促進活性について、従来の生育促進活性物質との比較を行なった。その結果、*Str. thermophilus*では、魚肉分解物、ビール酵母エキス、カジトン、フィッシュソルブル、米糠酵素分解物、カザミノ酸の順で生育活性が高い傾向を示した(Table3)。また、魚肉分解物は*L. bulgaricus*および他の乳酸菌に対しても生育促進活性が高いことを示した。ビフィドバクテリウム属細菌に対しても、魚肉分解物がビール酵母エキスと同等以上に生育促進活性を高めることを認めた(Table4)。

つぎに、魚肉分解物についてAmicon社(米国)製分子量分画膜による分画および活性炭処理を行い、さらにアミノ酸、核酸関連物質、ミネラル、ビタミンおよび各態窒素含量等の分析を行ない、生育促進活性成分の解析を行なった。その結果、最大の生育促進活性を示した画分は分子量500～1000であり、つぎに分子量500以下、分子量1000～10000の画分の順で、分子量10000以上の画分は最も弱い活性しか示さなかった(Table5)。また、魚肉分解物の活性炭処理を施したものは、生育促進活性がかなり小さくなることを認め、アミノ酸分析を行なった結果、一部の遊離アミノ酸が少なくなった(Table6, Table7)。また、核酸分析の結果、ウリジン、イノシン、ヒポキサンチン等を多く含有していた。魚肉分解物の乳酸菌およびビフィドバクテリウム属細菌の生育促進活性を示す成分は全ての画分にあり、アミノ酸、ペプチド、核酸が主成分であり、それらの総合力によって高い生育促進活性を示すものと推定された。

### 第四章 ビフィドバクテリウム属細菌を利用したヨーグルトの風味等の成分特性

ビフィドバクテリウム属細菌5菌株、*L. bulgaricus*および*Str. thermophilus*を単独もしくは混合スターターとして調製したヨーグルトの、ヘッドスペースガス中の成分をガスクロマトグラフィーにより、またヨーグルト中の有機酸を高速度液体クロマトグラフィーで分析を行なった。その結果、揮発性成分ではアセトアルデヒド、アセトン、2-ブタノン、エタノール、ジアセチルおよびジメチルスルフィドが検出された。ビフィドバクテリウム属細菌の単独スターターからは特異的な揮発性成分は検

出されなかったが、*B. breve* でアセトアルデヒドが、また、*B. longum*でエタノールの生成量が高かった。3菌株混合スターターを使用した場合は、ビフィドバクテリウム属細菌単独の場合よりアセトアルデヒドおよびジアセチル生成量は高値を示し、エタノール生成量は低値を示した。有機酸組成では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸および酢酸が検出された。ビフィドバクテリウム属細菌単独使用の場合酢酸の含有量が多くなったが、3菌株混合の場合は酢酸含有量は減少した(Table8, Table9)。これらの成分と嗜好性試験の結果について統計処理を施した場合、総合評価は酸味、組織、香り、アセトアルデヒド、ジアセチル、コハク酸および乳酸含有量と正の相関を示し、アセトン、エタノールおよび酢酸含有量と弱い負の相関を示した。さらに、ヨーグルト中の遊離アミノ酸、全アミノ酸、ビタミン、ミネラル、各態窒素、糖類および乳酸異性体を測定した。ビフィドバクテリウム属細菌を利用したヨーグルトの特長としては、ビタミンB<sub>12</sub> およびL-乳酸含有量が多く、遊離アミノ酸が少ないことが指摘された。

## 第五章 ビフィドバクテリウム属細菌を利用したヨーグルトの凝固とその物性におよぼす要因

ヨーグルトの物性におよぼす機構を解明するため、発酵速度 ( $\Delta\text{PH}/\Delta\text{T}$ ) がヨーグルトのカード粒子径におよぼす影響について検討した。その結果、粒子径の増大現象からみて、ヨーグルトの培養過程を3つに分けることができた。終了後のヨーグルトの粒子径に影響をおよぼす因子はPHの低下につれ粒子径が増大する段階における発酵速度であった。すなわち、培養条件が様々であってもカード形成開始から凝固完了までの発酵速度を測定することにより、培養終了後の粒子径はほぼ予測できることが明らかとなった。また、培養後のカード粒子径は、応力緩和による弾性率(Fig1)、粘性率(Fig2)、非破壊試験によるかたさ(Fig3)およびガム性に影響をおよぼし、相関することが明らかとなった。これらの物性のインディケータを測定し、発酵速度を制御することにより、従来以上にヨーグルトの物性を多面的に制御することが可能となった。

以上、本研究の結果、ビフィドバクテリウム属細菌の高い菌数レベルを維持し、酸味を抑え、風味および組織の優れた新しいタイプのプレインヨーグルトを製造するための基礎的諸条件が確立されたと考えられる。本成果の応用によって、各種の製品が市販されたばかりでなく、その製造技術はフランス、ベルギー、西独等に技術輸出されるに至っている。

Table 1. Viability of Bifidobacteria in the yogurt

Bifidobacterial species	on the initial day		after 7 days' storage		
	pH	Viable cell count/ml	pH	Viable cell count/ml	% Survivors
<i>B. bifidum</i> ATCC 15696	4.59	$6.2 \times 10^7$	4.50	$3.6 \times 10^6$	5.8
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	4.55	$7.5 \times 10^7$	4.47	$7.9 \times 10^6$	10.5
<i>B. breve</i> ATCC 15700	4.65	$1.3 \times 10^8$	4.54	$6.5 \times 10^6$	5.0
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15706	4.58	$2.4 \times 10^7$	4.44	$2.7 \times 10^6$	11.3
<i>B. longum</i> ATCC 15707	4.55	$1.1 \times 10^9$	4.50	$4.5 \times 10^7$	20.5

\*The plain yogurt samples were prepared by the standard method with the starter cultures of *L. bulgaricus*, *Str. thermophilus* and various species of Bifidobacteria which were derived from human intestinal tract.

Table 2 Effect of the ratio of viable cell count of *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus* on survival of Bifidobacteria in the yogurt

Str. thermophilus No	X of starter				the initial day			7 days after production				
	Str.	L.	B.	pH	Str. count	L. count	ratio of count	B. count	pH	B. count	survivor ratio of B. count	
STH-32	1	1.0	2.0	5.0	4.51	$4.1 \times 10^8$	$3.8 \times 10^8$	1.1	$1.5 \times 10^5$	4.37	$5.1 \times 10^3$	$3.4 \times 10^{-3}$
	2	1.5	1.5	5.0	4.50	$5.5 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	3.1	$1.7 \times 10^5$	4.38	$2.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^{-2}$
	3	2.5	0.5	5.0	4.53	$6.4 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	13.1	$1.6 \times 10^5$	4.40	$8.2 \times 10^4$	$5.1 \times 10^{-2}$
	4	2.8	0.2	5.0	4.57	$9.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	30.3	$1.6 \times 10^5$	4.40	$2.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^{-1}$
	5	5.9	0.1	5.0	4.55	$1.1 \times 10^9$	$2.3 \times 10^8$	47.8	$2.0 \times 10^5$	4.47	$1.3 \times 10^6$	$6.5 \times 10^{-1}$
STH-8205	6	1.0	2.0	5.0	4.50	$3.8 \times 10^8$	$3.9 \times 10^8$	0.97	$1.6 \times 10^5$	4.38	$1.5 \times 10^4$	0.94
	7	1.5	1.5	5.0	4.50	$6.2 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	3.6	$1.9 \times 10^5$	4.41	$2.8 \times 10^4$	1.5
	8	2.5	0.5	5.0	4.52	$6.5 \times 10^8$	$6.7 \times 10^8$	9.7	$1.9 \times 10^5$	4.44	$1.1 \times 10^5$	5.8
	9	2.8	0.2	5.0	4.55	$9.8 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	19.6	$2.1 \times 10^5$	4.45	$2.3 \times 10^5$	11.0
	10	5.9	0.1	5.0	4.55	$1.1 \times 10^9$	$2.5 \times 10^8$	44.0	$2.2 \times 10^5$	4.50	$4.5 \times 10^5$	20.5

(note) Str.: *Str. thermophilus*, L.: *L. bulgaricus*, B.: *B. longum*

count: /g, ratio of count: Str. count/L. count

Table 3 Effect of the growth stimulatory substances upon the acid production by *Str. thermophilus* STH-8205 after 24 hours' incubation

Stimulatory substances	0.1%		1.0%	
	Acidity(%)	Difference from the control(%)	Acidity(%)	Difference from the control(%)
Fish Meat Hydrolysate	1.10	0.28	1.36	0.58
Brewer's Yeast Extract	1.10	0.28	1.31	0.54
Casamino Acid	0.89	0.07	0.95	0.15
Enzymatic Hydrolysate of Rice Bran	0.90	0.08	1.00	0.18
Casitone	0.96	0.14	1.21	0.39
Fish Soluble Factor	0.92	0.10	1.04	0.22
Control		0.82		

Table 4 Effect of the fish meat hydrolysate and brewer's yeast extract upon the acid production by various strains of Bifidobacterium

Bifidobacterial strains	Taxonomy	Period of incubation in hours	Acidity (%)	
	Bergey		Fish meat hydrolysate	Brewer's yeast extract
B.B.- 1	<i>B. bifidum</i>	6	1.18	1.18
B.B.- 5	"	24	0.16	0.16
B.B.- 9	"	24	0.65	0.45
B.B.- 6	<i>B. breve</i>	24	1.58	1.22
B.B.-12	"	24	0.73	0.48
B.B.-15	"	24	1.58	1.70
M-16	"	24	1.44	0.96
B.B.- 7	<i>B. infantis</i>	24	0.56	0.24
M-92	↗	6	1.04	1.04
B.B.- 2	<i>B. longum</i>	6	1.20	1.20
B.B.-10	"	6	1.20	1.20
B.B.-14	"	24	0.52	1.54
B.B.-13	"	24	0.45	0.18



Table 5 Acidity of the yogurt with *Str. thermophilus* STH-8205 in the presence of the membrane-filtrated fractions of the fish meat hydrolysate

Fraction	Period of incubation in hours							
	8			24				
	Acidity	Acidity Increase*		Relative Increase of Acidity**	Acidity	Acidity Increase*		Relative Increase of Acidity**
	(%)	(%)	(%)		(%)	(%)	(%)	
M.W. >10,000	0.90	0.48	(112)	65	1.18	0.33	(44)	52
M.W. 10,000~1,000	1.08	0.66	(154)	89	1.32	0.57	(76)	89
M.W. 1,000~500	1.18	0.76	(181)	102	1.44	0.69	(92)	108
M.W. <500	1.14	0.72	(171)	97	1.38	0.63	(84)	98
Whole Fish meat hydrolysate	1.16	0.74	(176)	100	1.39	0.64	(85)	100
Charcoal-treated Fish meat hydrolysate	0.95	0.53	(126)	72	1.21	0.46	(61)	72
Control	0.42	0	(0)	—	0.75	0	(0)	—

\* Acidity increase was calculated by subtracting the acidity of the control milk product before fermentation from that of the respective yogurt, and (ratio of acidity increase) stands for the value which was calculated by an equation of

$$\frac{\text{Acidity Increase}}{\text{Acidity of the control milk product}} \times 100$$

\*\* Relative Increase of Acidity: Increase of acidity in the case of the addition of whole fish meat hydrolysate was taken as 100 and those values for other case were rated.

Table 6 Overall amino acid composition of the various growth stimulatory substances for lactic acid bacteria.

Amino acid	Fish meat hydrolysate		Brewer's yeast extract		Casamino acid		Charcoal-treated Fish meat hydrolysate	
	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)
Try	6.60	0.95	trace	—	0.61	0.14	0.22	0.03
Lys	38.38	5.50	49.72	9.01	47.00	10.96	59.68	9.43
His	38.32	5.49	15.32	2.78	12.00	2.80	34.18	5.40
NH <sub>5</sub>	11.31	—	6.45	—	27.00	—	(13.80)	—
Arg	29.99	4.27	25.37	4.60	15.50	3.61	24.06	3.80
Asp	62.08	8.89	56.14	10.17	34.80	8.12	46.77	7.39
Thr	28.51	4.08	31.73	5.75	19.70	4.59	29.95	4.73
Ser	27.31	3.91	25.73	4.66	26.70	6.23	24.63	3.89
Glu	102.52	14.68	71.37	12.93	105.5	24.60	95.48	15.09
Pro	37.51	5.37	28.18	5.11	60.90	14.20	34.68	5.48
Gly	58.00	8.30	31.90	5.78	9.33	2.18	45.35	7.17
Ala	55.69	7.97	49.11	8.90	16.10	3.75	52.18	8.25
Cys	6.14	0.88	4.78	0.87	1.12	0.26	7.05	1.24
Val	43.20	6.19	40.78	7.39	28.80	6.72	37.79	5.97
Met	19.19	2.75	9.90	1.79	4.56	1.06	18.39	2.91
I. leu	36.34	5.20	32.79	5.94	16.40	3.82	33.77	5.34
Leu	61.13	8.75	45.83	8.30	20.90	4.87	56.47	8.92
Tyr	19.48	2.79	7.38	1.34	2.43	0.57	10.94	1.73
Phe	28.04	4.01	25.94	4.70	6.47	1.51	20.44	3.23
Total	698.44	100.00	551.97	100.02	428.82	99.99	632.81	100.00

Table 7 Free amino acid composition of the various growth stimulatory substances for lactic acid bacteria.

Amino acid	Fish meat hydrolysate		Brewer's yeast extract		Casamine acid		Charcoal-treated Fish meat hydroysate	
	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)
Try	5.53	1.79	Trace	—	Trace	—	1.50	0.47
Lys	20.41	6.61	42.1	13.18	45.18	10.94	22.43	6.97
His	25.53	8.27	9.3	2.91	9.10	2.20	29.25	9.07
NH <sub>3</sub>	5.82	—	4.3	—	19.72	—	(5.59)	—
Arg	15.05	4.87	1.6	0.50	17.54	4.25	11.03	3.42
Asp	5.58	1.81	15.4	4.82	36.69	8.89	6.40	1.98
Thr	14.85	4.81	14.8	4.63	18.69	4.53	18.01	5.58
Ser	6.65	2.15	28.0	8.76	30.26	7.33	6.88	2.13
Glu	20.32	6.58	37.0	11.53	99.14	24.01	22.42	6.95
Pro	10.43	3.33	16.6	5.20	57.39	13.90	11.10	3.44
Gly	9.51	3.08	14.7	4.60	9.47	2.29	10.10	3.13
Ala	25.56	8.28	41.3	12.93	15.84	3.84	29.73	9.22
Cys	5.76	1.87	—	—	1.14	0.28	6.99	2.17
Val	23.97	7.76	21.6	6.76	23.17	5.61	25.26	7.83
Met	16.12	5.22	7.1	2.22	7.60	1.84	18.21	5.65
I. leu	21.64	7.02	18.1	5.67	11.69	2.83	22.47	6.97
Leu	47.07	15.25	29.9	9.36	20.52	4.97	50.59	15.68
Tyr	12.58	4.08	5.2	1.63	2.05	0.50	7.99	2.43
Phe	22.19	7.19	16.8	5.26	7.38	1.79	22.13	6.86
Total	308.75	100.00	319.5	100.00	412.85	100.00	322.54	100.00
rate of amino acid liberation	44.2%		57.9%		96.3%		51.0%	

rate of amino acid liberation was calculated by an equation of  $\frac{\text{Free amino acid}}{\text{Total amino acid}} \times 100$

Table 8 Concentration of volatile components in the top gas space and organic acids in the yogurt and the fermentation profile of the yogurt with single starter.

Sample Component	1 Raw-milk		2 Raw-milk B. Culture Medium	3 Acidified pH 4.6 with phosphoric acid.	4 LBU1088	5 SIH8205	6 B. longum BB-536	7 B. breve ATCC- 15700	8 B. bifidum ATCC- 15696	9 B. longum ATCC- 15707	10 B. longum ATCC- 15708
	un- heated	Heated for 20 min at 90°C									
Acetaldehyde (ng/ml)	—	0.36	0.62	0.33	44.28	24.97	44.69	77.48	12.46	30.98	45.28
Dimethylsulfide	1.72	26.33	24.10	26.33	22.31	16.86	27.62	27.38	23.58	19.53	21.20
Acetone	9.57	12.58	11.27	9.20	14.20	9.17	11.41	11.61	12.20	10.99	11.40
2-Butanone	0.25	0.64	0.63	0.59	0.53	0.45	0.53	0.60	0.58	0.60	0.54
Ethanol	0.66	3.56	6.93	3.42	13.05	6.92	71.01	62.13	54.66	13.41	18.43
Diacetyl	—	—	0.46	—	0.84	1.84	0.82	0.75	0.61	0.51	0.77
Citric acid (ng/g)	2.74	—	2.41	1.93	1.85	1.85	1.75	1.80	1.88	1.72	1.73
Malic acid	0.01	—	0.03	0.03	0.02	0.06	—	—	—	—	—
Succinic acid	—	—	—	—	0.28	0.02	0.06	0.03	—	0.03	0.04
Lactic acid	0.02	—	0.02	0.02	4.68	5.27	2.61	2.29	0.97	2.08	2.38
Formic acid	0.06	—	0.02	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	0.06	—	0.01	0.02	0.14	0.06	2.98	2.75	1.08	2.39	2.75
Propionic acid	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
n-Butyric acid	—	—	—	0.02	0.06	—	—	—	—	—	—
others	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Period of fermenta- tion (hour)	—	—	—	—	18	18	18	18	18	18	18
pH of fermented milk	6.50	—	6.50	4.60	4.70	4.70	4.55	4.60	5.50	4.65	4.56
Acidity of ferm- ented milk (%)	0.14	—	0.14	1.05	0.65	0.68	0.89	0.82	0.44	0.80	0.88
Count of Bifido bacteria (/ml)	—	—	—	—	—	—	$542 \times 10^6$	$416 \times 10^6$	$33 \times 10^6$	$425 \times 10^6$	$550 \times 10^6$
Count of Lactobaci- lli (/ml)	—	—	—	—	$35 \times 10^6$	$236 \times 10^6$	—	—	—	—	—
Count of mold and yeast (/ml)	< 10	—	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Table 9. Concentration of volatile components in the top gas space and organic acids in the yogurt and the fermentation profile of the yogurt with mix starter.

Component	11	12	13	14	15	16
	LBU1088 STH8205	LBU1088 STH8205 B. B. 536	LBU1088 STH8205 B. breve 15700	LBU1088 STH8205 B. bifidum 15696	LBU1088 STH8205 B. longum 15707	LBU1088 STH8205 B. longum 15708
(ng/ml)						
Acetaldehyde	56.79	95.19	76.25	80.91	71.10	85.58
Dimethylsulfide	18.01	29.63	25.45	21.12	17.27	16.79
Acetone	9.87	11.41	10.48	11.00	10.33	10.70
2-Butanone	0.59	0.63	0.59	0.57	0.49	0.54
Ethanol	2.67	35.35	29.39	3.61	3.47	4.29
Diacetyl	2.15	3.66	2.63	2.58	2.45	2.33
(ng/g)						
Citric acid	1.91	1.66	1.83	1.85	1.69	1.82
Malic acid	—	—	—	—	—	—
Succinic acid	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06
Lactic acid	6.64	7.04	7.08	7.05	6.41	6.97
Formic acid	—	—	—	—	—	—
Acetic acid	0.07	0.22	0.14	0.11	0.21	0.18
Propionic acid	—	—	—	—	—	—
n-Butyric acid	—	—	—	—	—	—
others	—	—	—	—	—	—
Period of fermentation (Hour)	4 <sup>25</sup>	4 <sup>25</sup>	4 <sup>25</sup>	4 <sup>25</sup>	4 <sup>25</sup>	4 <sup>25</sup>
pH of fermented milk	4.30	4.30	4.28	4.26	4.22	4.24
Acidity of fermented milk (%)	0.87	0.95	0.94	0.94	0.92	0.94
Count of Bifido bacteria (/ml)	—	235 × 10 <sup>6</sup>	230 × 10 <sup>6</sup>	60 × 10 <sup>6</sup>	230 × 10 <sup>6</sup>	238 × 10 <sup>6</sup>
Count of Lactobacilli (/ml)	1590 × 10 <sup>6</sup>	857 × 10 <sup>6</sup>	1230 × 10 <sup>6</sup>	1311 × 10 <sup>6</sup>	1640 × 10 <sup>6</sup>	1280 × 10 <sup>6</sup>
Count of mold and yeast (/ml)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

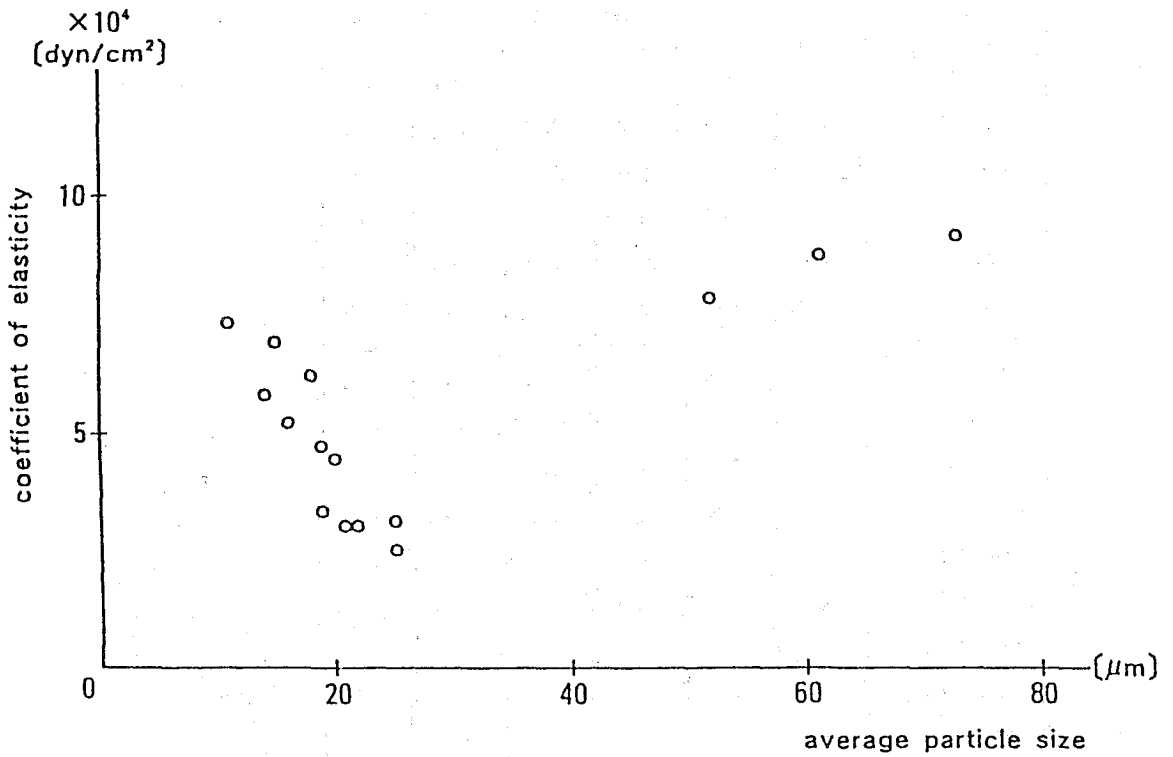


Fig.1 Effect of average particle size after fermentation on the coefficient of elasticity of yogurt

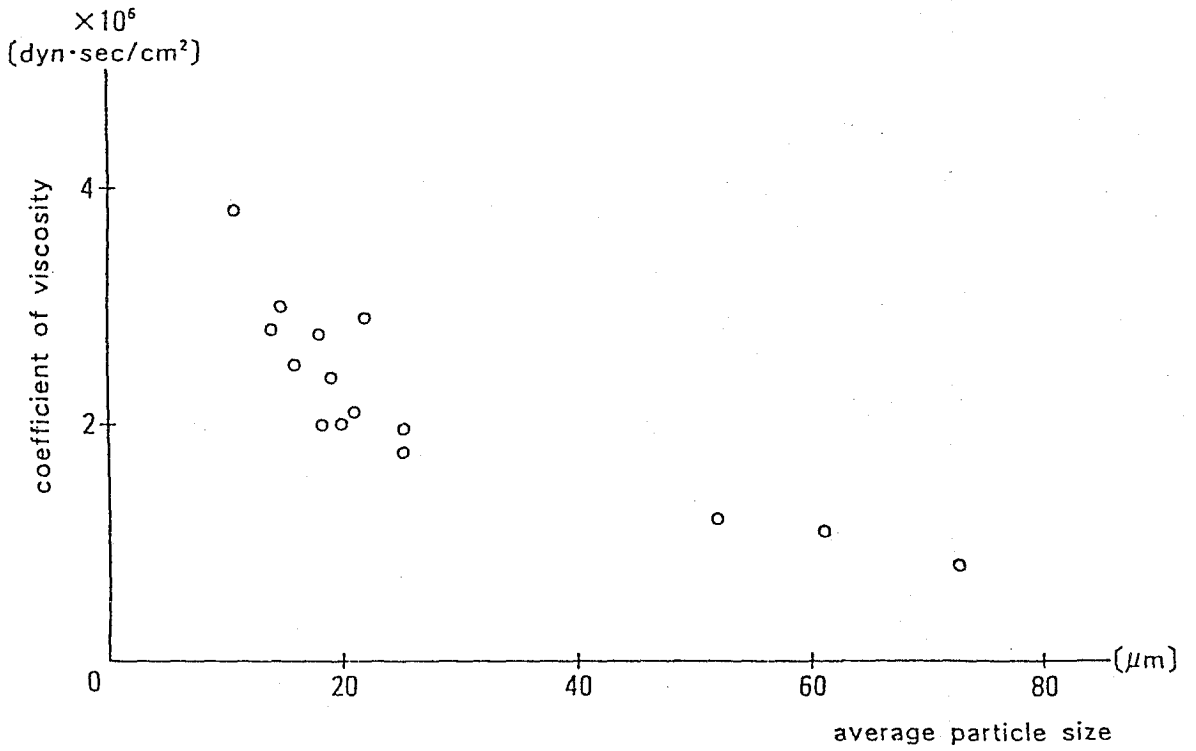


Fig.2 Effect of average particle size after fermentation on the coefficient of viscosity of yogurt

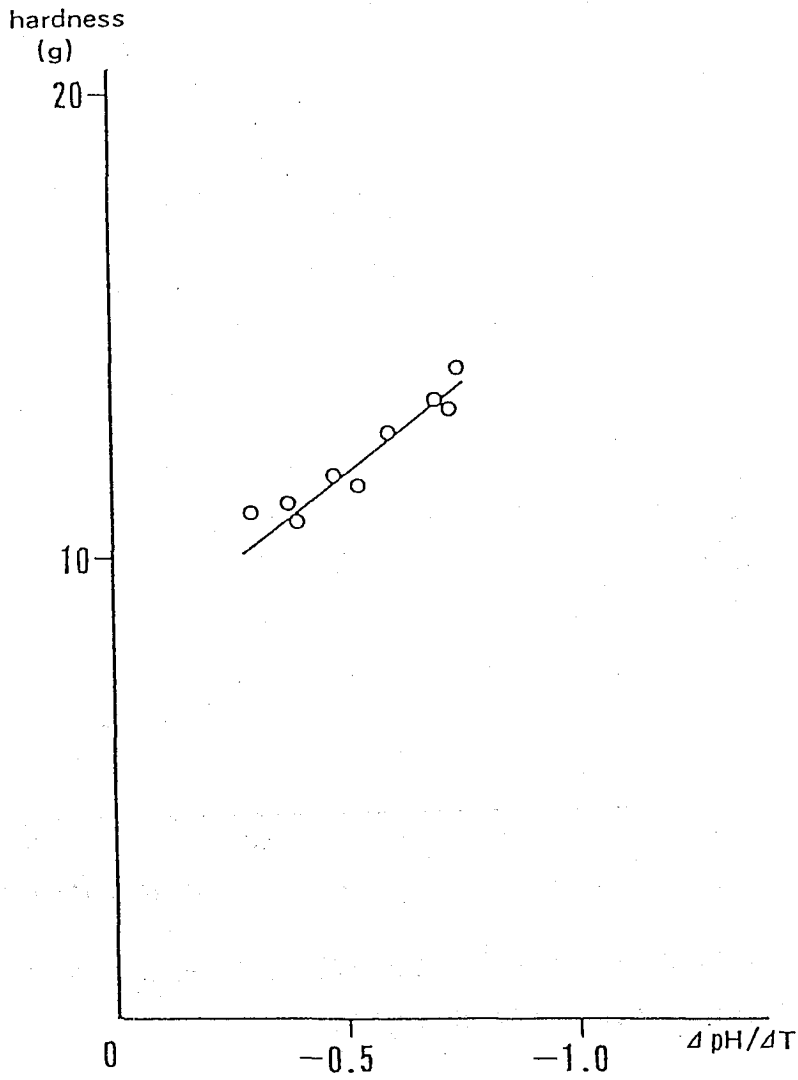


Fig.3 Effect of fermentation velocity on hardness (nondestructive)



## 審査結果の要旨

成人の腸内有用細菌ビフィドバクテリウムを使用した発酵乳の開発は永年にわたって期待されながら、その取扱の困難性の故に見送られてきた。本論文は、牛乳におけるビフィドバクテリウムの生育条件を明らかにすることによって、本細菌を利用したヨーグルト製造の基礎を確立しようとしたものである。

著者はまず、ヨーグルト中におけるビフィドバクテリウム属細菌の生残性におよぼす要因の解析を詳細に行い、ヨーグルトの培養中および保存中に生成する酸素がその生残性に大きな影響を与えることを見出し、酸素吸収能の高い *Streptococcus thermophilus* を *Lactobacillus bulgaricus* と共生する菌数範囲 (40:1) 内で用いることによって、生残性が大幅に改善されることを明らかにした。

ついで、ビフィドバクテリウム属細菌をヨーグルト中に増殖させるために生育促進物質源として魚体に *Bacillus polymyxa* のプロテアーゼを作用させて調製した魚肉分解物が有用であることを認めた。この魚肉分解物の生育促進活性は分子量500~1000のペプチド画分に最大の分布を示したが、他のペプチド、アミノ酸、核酸の総合的影響によってもたらされると推定した。

さらに、ビフィドバクテリウム属細菌を使用したヨーグルトの風味成分の解析を行い、ジアセチルおよびアセトアルデヒド含量が評価と正の相関を有することを指摘するとともに、ヨーグルトの発酵速度がカードの粒子径と密接に関係することを明らかにし、その品質管理への応用の可能性を検討した。

以上の結果は、ビフィドバクテリウム属細菌を利用したヨーグルト製造の基礎を固めたものとして、乳業技術のみならず、科学の進歩に貢献するところが大きい。よって、審査員一同は、本研究に対し農学博士の学位を授与するに値するものと判定した。