

ヨーグルト脱酸素発酵技術の開発

堀内 啓史

一般に、ヨーグルトは2種の乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ブルガリア菌) と *Streptococcus thermophilus* (サーモフィルス菌) の共生作用で乳を発酵させて生産する。これらの乳酸菌は、通性嫌気性菌であり、酸素の存在下でも活発に生育する。そのため、従来、酸素がヨーグルトの発酵に及ぼす影響について着目した研究はほとんどなかった。そこで筆者らは、ヨーグルト乳酸菌であるLB81乳酸菌 (ブルガリア菌2038株とサーモフィルス菌1131株) を用いて、酸素が発酵に及ぼす影響についての研究を行った。結果、LB81乳酸菌は発酵中に培地 (乳) の溶存酸素を減少させ、およそ0 ppmに到達した後、活発な増殖を開始することが明らかとなった。このことにより、予め乳中の溶存酸素を減じてから発酵することで発酵時間を短縮できることを見いだした (脱酸素発酵法)。また、「脱酸素発酵法」を「低温発酵」 (通常、ヨーグルトは40~45°C程度で発酵する。筆者らは、これより低い発酵温度を「低温発酵」と定義した) と組み合わせる (脱酸素低温発酵法) ことで、まろやかなヨーグルトの製造に成功し、現在、工業生産において実用化している。また、筆者らは「脱酸素発酵法」の発酵時間短縮効果のメカニズム解明にも取り組み、「溶存酸素はブルガリア菌2038株とサーモフィルス菌1131株の共生作用の発現を阻害する」ことを示唆する結果を得た。

はじめに

日本では、1950年にヨーグルトの本格的な工業生産が開始されて以来、着実に市場が拡大してきている。最近10年間でみると、ヨーグルトの市場は消費者の健康志向を背景に2倍近い伸びを示し、現在、約3000億円の巨大な市場となっている。

日本におけるヨーグルトの歴史は、奈良時代に「酪 (らく)」といわれる酸凝固した牛乳が始まりとされている。しかし、これは朝廷に献上されるような極上品で、ほんの一部の人だけが口にできたものであった。ヨーグルトが一般庶民の口に届くようになったのは、明治時代も半ばになったころである。

一方、世界に目を向けると、ヨーグルトをはじめとする発酵乳の歴史は古く、約7000年前といわれている。ブルガリアのあるバルカン半島や、トルコあたりが発祥の

地とされているが、中東やモンゴル、北欧などでも独自に発酵乳が誕生し、伝統食として育まれてきた。そして、それぞれの地域の気候・風土条件によって、伝統的な発酵乳の製造法は定まっていたようである。近代的なヨーグルトの製造工程も伝統的な方法と大きくは変わらず、基本的に乳の十分な殺菌、純粋培養した乳酸菌の植え付け、発酵温度の管理といった手順によるものであった¹⁻³⁾。しかし、筆者らは、ブルガリアの伝統的なヨーグルト⁴⁾を科学することで、ヨーグルトの新たな発酵技術「脱酸素低温発酵法」の開発に成功した。本稿では、この新発酵技術について紹介する。

ブルガリアの伝統的なヨーグルト

一般に、工業的なヨーグルトは、図1に示したような連続的な製造工程によって作られる。すなわち牛乳、脱脂粉乳、バターなどを混合溶解したヨーグルトミックスを殺菌し、ヨーグルト乳酸菌であるブルガリア菌とサーモフィルス菌 (スターター) を添加し、紙容器などに充填してから40~45°Cで発酵させる。発酵は、所定の乳酸酸度 (濃度) になるまで行い、冷却によって発酵を止める。無脂乳固形分10%程度のヨーグルトの場合、乳酸酸度0.7%程度 (PH: 約4.7) まで発酵する。

素焼きの壺で作るヨーグルト ヨーグルトの本場ブルガリアには、素焼きの壺で作る昔ながらの伝統的なヨーグルトがある (図2)。絞りたての牛乳を煮立てて人肌くらいに冷ましてから、素焼きの壺に入れ、前日作っておいたヨーグルトを種菌 (スターター) として加える。その壺を布で包んで保温して放置すると、発酵してヨーグルトになっていく。発酵中に素焼きの壺が牛乳から水分を吸収し、牛乳が濃縮され、さらに壺の表面からその水分が蒸発する際に気化熱を奪うため「低温発酵」となる。このようにして作られたヨーグルトは、なめらかでコクがあり非常においしい。そこで、この伝統的なヨー

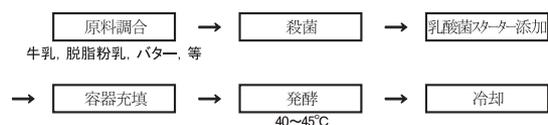


図1. 一般的なヨーグルトの製造工程



図2. 素焼きの壺で作るブルガリアの伝統的なヨーグルト

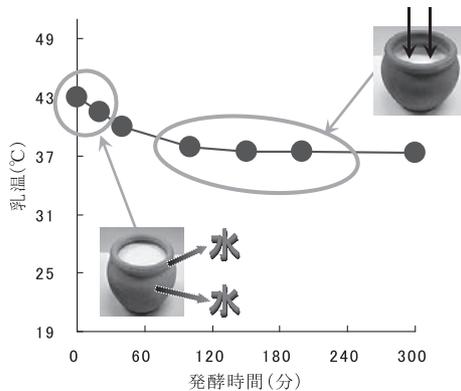


図3. 素焼きの壺で発酵させた乳の発酵中の温度変化

グルトを工業的に再現しようと試みた。まず、実験室にて伝統的なヨーグルトを再現するところから検討を開始した。43°Cに加熱した牛乳を素焼きの壺に注ぎ、スターター（LB81 乳酸菌）を加え、43°Cの培養庫にて発酵させた。結果、時間と共に牛乳の温度は低下し、発酵終了時には37°C程度になっていた（図3）。また、発酵終了後、牛乳は約1.2倍に濃縮されていた。したがって、この伝統的なヨーグルトは、“濃縮した牛乳”を「低温発酵」させることで工業的に再現できると考えられた。“濃縮した牛乳”は、牛乳、脱脂粉乳、バターなどを原料として容易に再現できた。

低温発酵 次に、「低温発酵」について検討した。「低温発酵」は、非常になめらかな組織のヨーグルトを作り出すことができるメリットがある反面、発酵に長時間を要するデメリットがある。通常、ヨーグルトの発酵は乳酸菌の乳酸生成が最も活発な40～45°Cで行う（通常発酵）が、37°C程度で「低温発酵」を行うと、発酵の進行は著しく遅延する。LB81 乳酸菌を用いた「低温発酵」では、「通常発酵」に比べて発酵時間が約40分間長くなった（図4）。これは、工業的大量生産を行う場合の生産性

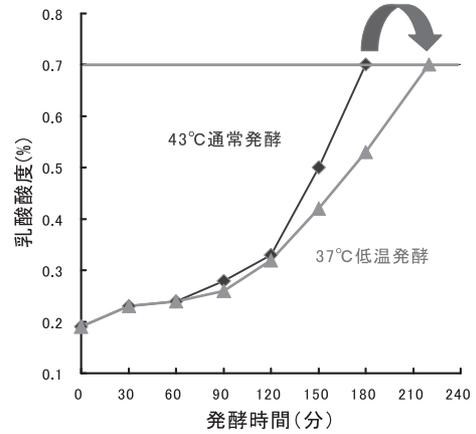


図4. 低温発酵による発酵時間の遅延

を大きく低下させる。よって、「低温発酵」を工業化するためには、発酵時間を短縮させる新たな発酵法の確立が不可欠であった。

脱酸素発酵法

ヨーグルトの発酵過程における乳中の溶存酸素と乳酸菌の挙動に着目して研究した。結果、乳酸菌を添加する前の乳中の溶存酸素濃度は43°Cで7 ppm程度であったが、乳酸菌を添加後、まず乳中の溶存酸素濃度低下が認められ、0 ppm程度に下がった後に乳酸の生成が活発になることが分かった（図5）。なお、培養（発酵）中に溶存酸素濃度が0 ppmまで低下する現象は、ブルガリア菌、サーモフィルス菌の単独培養時、混合培養時ともに認められなかった。

このことから、溶存酸素がヨーグルトの発酵を阻害すると推察した。そこで、予め乳中の溶存酸素濃度を減らし、嫌気状態としてから発酵することで、発酵時間を短縮できると考え検討した。その結果、通常7 ppm程度あ

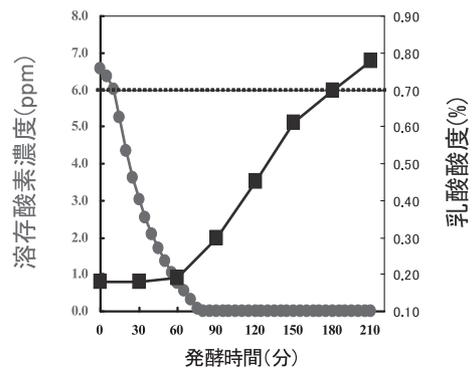


図5. ヨーグルト発酵中の溶存酸素濃度変化と乳酸酸度変化

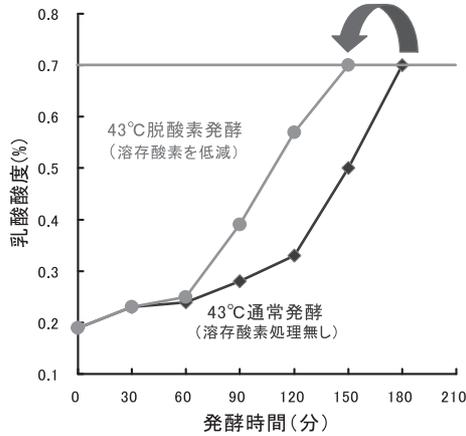


図6. 「脱酸素発酵法」による発酵時間短縮効果

る溶存酸素濃度を4 ppm以下に減らすことで発酵時間を短縮できることが分かった。LB81 乳酸菌を用いたヨーグルトの発酵時間は、溶存酸素濃度を低下させない通常の発酵と比べて43°Cで約30分間短縮された(図6)。乳中の溶存酸素濃度を減らしてから発酵する方法を「脱酸素発酵法」と命名した。

脱酸素低温発酵法

この「脱酸素発酵法」の発酵時間短縮効果により、「低温発酵」の工業化が可能となった。この「低温発酵」と「脱酸素発酵法」を組み合わせた製法を「脱酸素低温発酵法」と命名した(2005年特許取得)。

伝統的なヨーグルトの工業的再現 「脱酸素低温発酵法」を用いて、“濃縮した牛乳”に相当する組成に調製したヨーグルトミックス(無脂乳固形分10.0%、乳脂肪分4.5%程度)を発酵させたところ、素焼きの壺で作ったような、なめらかでコクのあるヨーグルトとなった。「脱酸素低温発酵法」の開発により、ブルガリア伝統の素焼きの壺で作るヨーグルトの風味・物性を工業的に再現することに成功し、2004年「明治ブルガリアヨーグルトLB81ドマッシュノ」(図7)として発売した。図8にその製造工程を示す。2010年現在、本商品は終売しているが、「脱酸素低温発酵法」に乳糖分解技術を加えた「明治ブルガリアヨーグルトLB81そのまま」を後継商品として発売している(図9)。

ヨーグルトのカード形成時間 「低温発酵」がなめらかな組織のヨーグルトを作り出せる理由は、「低温発酵=長時間発酵」であるため、じっくり時間をかけて発酵が進むためであると考えられる。しかし、「脱酸素低温発酵法」は、短時間の発酵にもかかわらず「低温発酵」と同等以上のなめらかさをもったヨーグルトを作り出せるこ



2004年～2008年まで発売

ブルガリア国伝統ヨーグルトの風味を再現した濃厚でなめらかでクリーミーなヨーグルト

図7. 明治ブルガリアヨーグルトLB81ドマッシュノプレーン

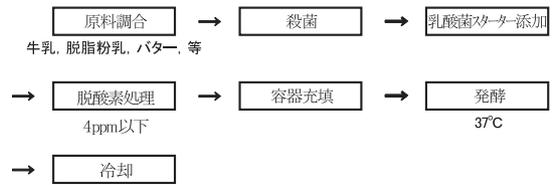


図8. 「脱酸素低温発酵法」によるヨーグルトの製造工程

商品コンセプト

そのまま食べておいしい酸味控えめの
まろやか風味プレーンヨーグルト

技術

- ・乳酸菌 : LB81乳酸菌
ヨーグルトらしい爽やかさ
- ・発酵技術 : 「脱酸素低温発酵法」
なめらかな食感
酸味の少ないまろやかな風味
- ・乳糖分解技術
甘みの付与 = 酸味低減
- ・NF膜処理技術
すっきりとした後味

2007年10月～

図9. 明治ブルガリアヨーグルトLB81そのままプレーン

とが分かった。なお、食感のなめらかさは、物理的測定結果と官能評価を指標として判定した。

この現象について考察を加えた。図10は「脱酸素低温発酵法」(37°C)、「通常発酵」(43°C)、「低温発酵」(37°C)で発酵させた時の発酵中の乳酸酸度変化を示したものである。一般的に無脂乳固形分10.0%程度の発酵乳では、カードと呼ばれるヨーグルトの組織形成が乳酸酸度0.4%付近から始まる(ヨーグルトが固まり始める)。筆者らは、発酵終了の乳酸酸度を0.7%としているので、乳酸酸度0.4%から0.7%に到達するのに要する時間が、ヨーグルトの組織を作る時間(カード形成時間)といえる。このカード形成時間が長いほどヨーグルトの組織は緻密で

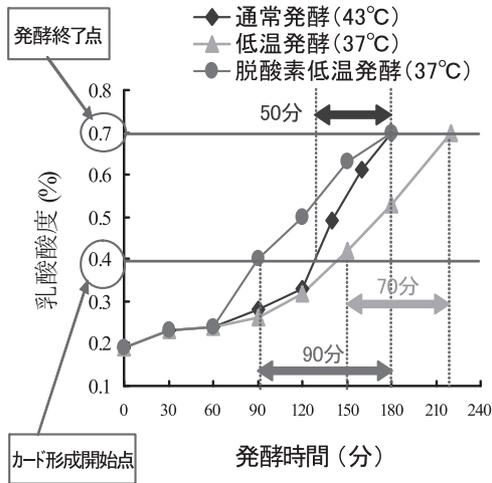


図10. ヨーグルトのカード形成時間

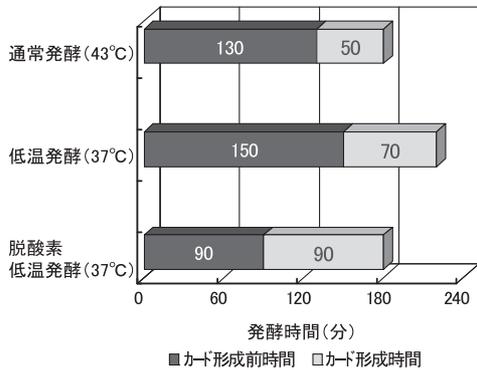


図11. 発酵時間に占めるカード形成前時間とカード形成時間の割合

なめらかになると考えられる。カード形成時間は「脱酸素低温発酵法」で90分間、「通常発酵」で50分間、低温発酵で70分間となっており、「脱酸素低温発酵法」のカード形成時間が最長であることが認められた。

図11は、発酵時間を乳酸酸度0.4%未満のカード形成前時間（ヨーグルトが液状の状態）とカード形成時間に分けて示すものである。「脱酸素低温発酵法」のカード形成時間は、発酵時間180分間中90分間、「通常発酵」は180分間中50分間、「低温発酵」では220分間中70分間である。「脱酸素低温発酵法」は、全体の発酵時間に占めるカード形成時間の割合が高く、これが、短時間の発酵でありながら、緻密さとなめらかなさをもったヨーグルトの組織を作り出せる要因であると考えられる。

硬さとなめらかさの両立 「脱酸素低温発酵法」を適用したヨーグルトは、“流通の衝撃でも崩れにくい、しっかりとした硬さをもったヨーグルト組織（カード）”と“なめらかな食感”を両立していることが特長として挙げ

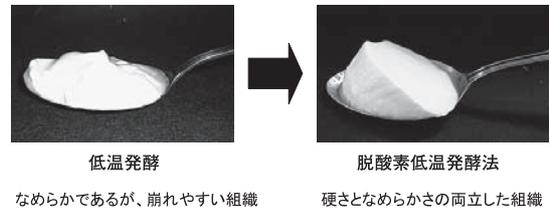


図12. ヨーグルトの組織に及ぼす発酵法の影響



低脂肪化、無脂肪化で失われるコク（濃厚感）を、ゼラチンや寒天等に頼ることなく、「脱酸素低温発酵法」で補完し、従来にない“おいしい”低脂肪、無脂肪ヨーグルトを実現

図13. 低脂肪・無脂肪ヨーグルト

られる。これら2つの特性は、どちらも商品価値の観点から重要であるが、従来の発酵技術で、これらを両立させることは不可能であった。一般的に、カードが硬いと食感のなめらかさは失われ、食感のなめらかさが増すとカードの硬さが低下するからである。理論の解明は今後の課題であるが、「脱酸素低温発酵法」は、発酵時間の短縮以外に、本来は相反する品質特性を両立させることができる画期的な製法といえる（図12）。

低脂肪および無脂肪ヨーグルトへの応用 「脱酸素低温発酵法」で作られるヨーグルトは、組織が緻密になることで、脂肪が増したようなコクのある風味となることが分かった。この利点を応用し、従来にはない“おいしい低脂肪ヨーグルト”および“おいしい無脂肪ヨーグルト”が実現できた。低脂肪および無脂肪ヨーグルトの欠点である“コクのなさ”や“水っぽさ”を、寒天やゼラチンなどの添加物に頼ることなく、新発酵技術によって補うことに成功した。2010年現在、図13に示したヨーグルト商品「明治プロビオヨーグルト LG21 低脂肪」、「明治ヨーグルト 美しいあしたの低脂肪」および「明治ブルガリアヨーグルト LB81 脂肪ゼロ」に「脱酸素低温発酵法」を適用している。

脱酸素発酵法のメカニズム解明への取り組み

筆者らは「脱酸素発酵法」のメカニズム解明にも取り組んだ⁵⁾。「なぜ、酸素を低減すると発酵が促進されるのか」、「酸素がLB81乳酸菌の生育にどのような影響を及ぼしているのか」といった観点から研究を進めてきた。以降、これまでの検討結果について示す。

ブルガリア菌とサーモフィルス菌の共生作用 図14は、乳をブルガリア菌とサーモフィルス菌で培養した時の発酵時間と酸度変化を示しているが、単菌培養の場合に比べて混合培養した場合、乳酸の生成が活発になることがある。ブルガリア菌とサーモフィルス菌の混合培養時、ブルガリア菌は乳中のカゼインを分解してペプチドなどを生成し、サーモフィルス菌はギ酸を生成する。これらペプチドとギ酸は、サーモフィルス菌とブルガリア菌のお互いの生育を刺激する。このような物質のやり取りを共生作用という(図15)。ただし、共生作用の顕著な効果は菌株によって異なる。ヨーグルトはこの乳酸菌の共生作用を利用して製造されている。

ヨーグルト発酵に対する溶存酸素の影響～溶存酸素濃度を固定した発酵～ 筆者らは、乳中溶存酸素濃度を

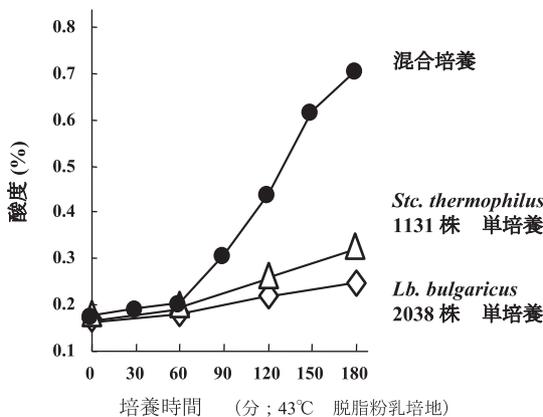


図14. 混合培養による乳酸発酵速度(生育)の促進

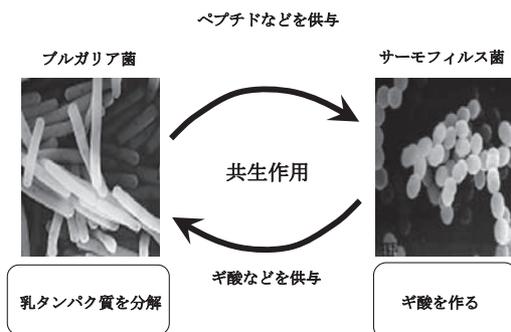


図15. ブルガリア菌とサーモフィルス菌の共生作用

変えることにより、ヨーグルト発酵に及ぼす酸素の影響について検討した。実験にはブルガリア菌2038株とサーモフィルス菌1131株を用いた。発酵はすべて10%脱脂粉乳培地で43°Cにて行った。また、発酵法を培地の溶存酸素設定条件によって3つに分けた。

- ①通常発酵法：培地の溶存酸素濃度を調整せず発酵を行った。発酵中に溶存酸素は、初発の6 ppmからほぼ0 ppmまで低減した。
- ②脱酸素発酵法：予め培地に窒素を通気し溶存酸素濃度を0 ppmにしてから発酵を行った。
- ③DO固定発酵法：乳酸菌が行う酸素除去活動を阻害し、溶存酸素濃度が減らないように調整した。具体的にはジャーなどを用い、培地中にエアと窒素を交互に通気して溶存酸素を一定濃度に固定しながら発酵を行った。今回はDOを0～6 ppmに固定して発酵した。

図16は、培地の溶存酸素濃度を4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0 ppmに固定した条件での発酵(DO固定発酵法)における酸度変化を示している。溶存酸素を0 ppmに固定した発酵の場合、溶存酸素を処理しない場合に比べて酸度の上昇速度が速まった。つまり、発酵速度が速まったが、1 ppmでは発酵速度が著しく低下し、2 ppm, 4 ppmに固定した場合、発酵がほとんど進まなかった。このことから、溶存酸素がヨーグルト発酵を顕著に阻害していると考えられた。

単菌の生育に対する「脱酸素発酵法」の効果 次に、ブルガリア菌2038株、サーモフィルス菌1131株単菌に対する「脱酸素発酵法」の効果について検討した。ヨーグルト発酵では、予め溶存酸素を0 ppmに低減してから発酵する「脱酸素発酵」によって発酵は促進されたが、2038株、1131株共に単菌培養時には、脱酸素発酵による発酵時間短縮効果は、ほとんど認められなかった(図17)。また、単菌の生育には溶存酸素の濃度が影響しなかったことから、溶存酸素は、乳酸菌の生育を阻害するのではなく、共生作用を阻害すると考えられた。

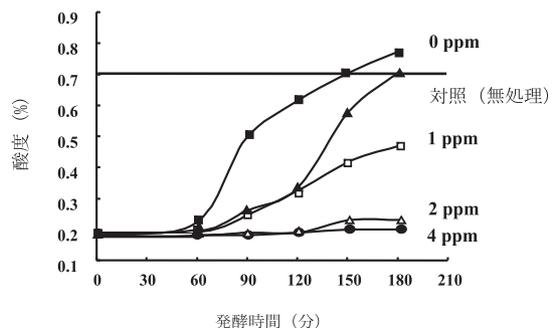


図16. 溶存酸素濃度を固定した発酵

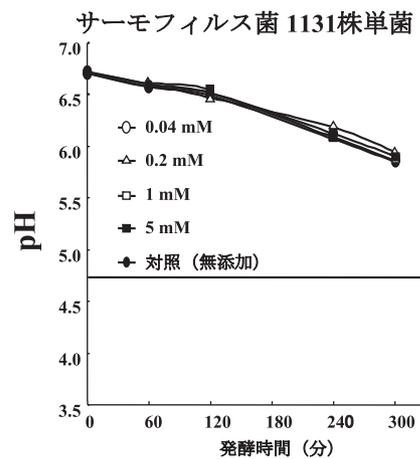
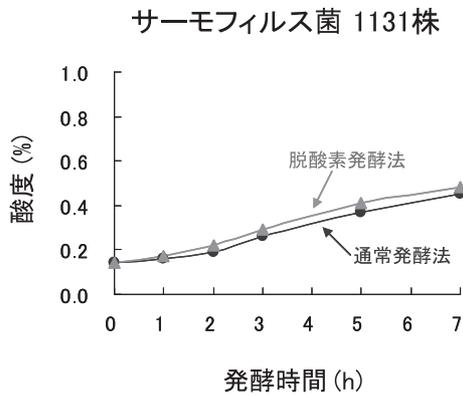
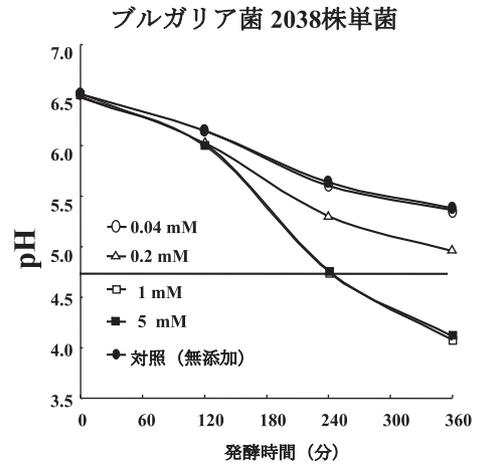
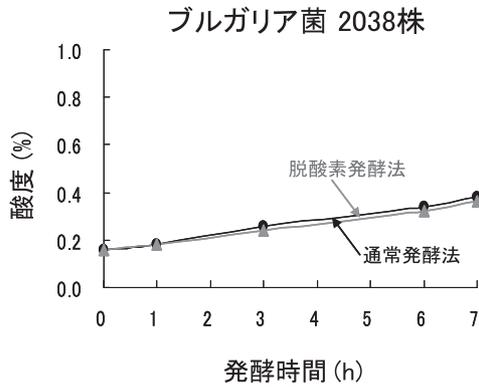


図17. 単菌の生育に対する「脱酸素発酵法」の効果

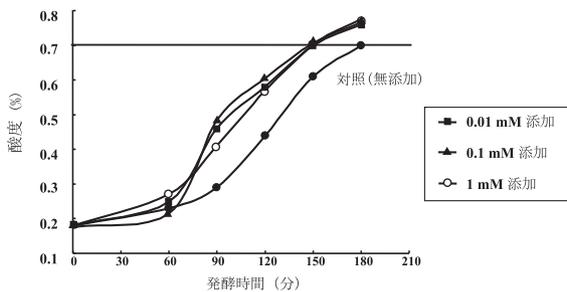


図18. ギ酸がヨーグルト発酵に及ぼす影響

図19. ギ酸が乳酸菌単菌の生育に及ぼす影響

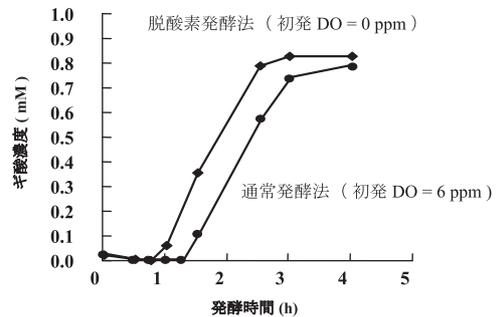


図20. ギ酸が乳酸菌単菌の生育に及ぼす影響

ギ酸がヨーグルト発酵に及ぼす影響 そこで、筆者らは、共生作用におけるブルガリア菌の生育促進物質の1つであるギ酸に着目した。まず、ヨーグルト発酵に及ぼすギ酸添加の影響について調べた。結果、ギ酸 Na を 0.01 mM 添加すると発酵が促進された。これは「脱酸素発酵」による発酵時間短縮効果と同等であった (図18)。

ギ酸が乳酸菌単菌の生育に及ぼす影響 次に、乳酸菌単菌培養に及ぼすギ酸の影響について調べた。図19に示したように、ブルガリア菌2038株はギ酸 Na を 0.2 mM 以上の添加することで発酵が促進されたが、サーモフィルス1131株単菌では効果は認められなかった。

ヨーグルト発酵中に検出されるギ酸 次にヨーグル

ト発酵中に培地に蓄積されるギ酸量を F-kit を用いて測定した (図20)。発酵中、ブルガリア菌はギ酸を消費すると考えられるので、図20に示したギ酸濃度はサーモフィルス菌が生成したギ酸とブルガリア菌が消費したギ酸の差であると考えられる。「脱酸素発酵法」と通常発酵で比較した結果、培地中にギ酸が検出され始める時間が脱酸素発酵法では約30分早まった。

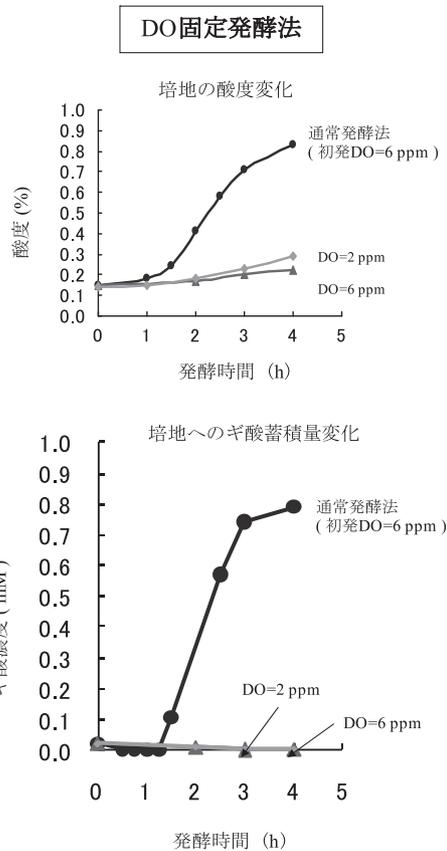


図21. 乳酸蓄積量に及ぼす溶存酸素の影響

ヨーグルト発酵中の乳酸蓄積量に及ぼす溶存酸素の影響

次に、ヨーグルト発酵中の乳酸蓄積量に及ぼす溶存酸素の影響について調べた。培地中の溶存酸素濃度を2 ppmおよび6 ppmの一定濃度に固定した場合、いずれも発酵がほとんど進まなかった。そして、この時の乳酸濃度を測定した結果、培地への乳酸の蓄積はまったく認められなかった。すなわち、わずか2 ppmの溶存酸素が乳酸の生成を抑制し、結果として共生作用の発現を抑制したと考えられた(図21)。

乳酸によるヨーグルト発酵の遅延回復

次に、溶存酸素濃度を固定したヨーグルト発酵の系に乳酸を添加した場合について検討した。乳酸 Na を1 mM濃度で添加し、溶存酸素濃度を6 ppmおよび0 ppmに固定して発酵した。結果、もともと発酵が促進されている0 ppmに固定した発酵においては、乳酸添加によりさらに発酵が促進されることはなかったが、発酵が著しく阻害される6 ppmに固定した場合においては、乳酸を添加することで発酵の遅延が大幅に回復した(図22)。

「脱酸素発酵法」のメカニズム解明に関する検討結果のまとめ

1) 培地中の溶存酸素を低減して発酵すると発酵時間を短縮できるが、これは、サーモフィルス菌のギ

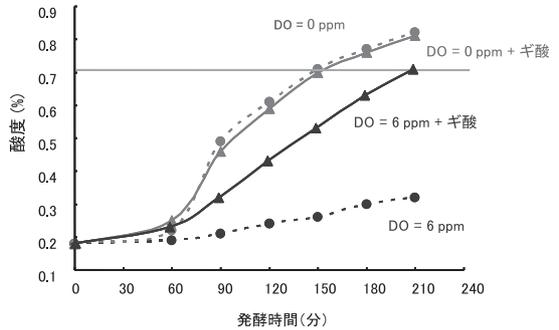


図22. 乳酸によるヨーグルト発酵の遅延回復

酸生成を早めるためであると推定された。2) 培地中溶存酸素はサーモフィルス菌の乳酸生成を阻害し、ヨーグルト発酵における共生作用の発現を抑制すると推定された。

おわりに

従来、ヨーグルトの製造において、発酵開始時に乳の溶存酸素濃度をコントロールして、発酵時間を操作する(短縮する)という発想はなかった。それは、ヨーグルトスターターであるブルガリア菌とサーモフィルス菌の共生作用による発酵は、酸素の存在下においてもスピーディーに進行するからである。しかし、今までほとんど注目されてこなかった“ヨーグルト乳酸菌に対する酸素の影響”に着目したことで、新しいヨーグルトの発酵技術を確立することができた。「脱酸素低温発酵法」は、2010年現在、4つの市販ヨーグルト商品に応用しているが、今後さらに本技術を応用したヨーグルト商品を展開し、ヨーグルト市場の活性化に寄与したいと考える。

また、ヨーグルトはその歴史が非常に古く、その発酵については、分かっているようで解明しなければならないことが数多くある。ブルガリア菌とサーモフィルス菌の共生作用はその代表例である。今回、「脱酸素発酵法」に関する研究を進めていく中で、酸素が共生作用に影響していることを突き止めたことは、共生作用のメカニズム解明の大きな手がかりになると考える。今後も研究を継続し、ヨーグルト乳酸菌の共生作用のメカニズムを解明したいと考えている。

文 献

- 1) 乳酸菌研究集談会編：乳酸菌の科学と技術，学会出版センター(1996)。
- 2) 中澤勇二ら：発酵乳類の機能，食品資材研究会(1988)。
- 3) 小崎道雄編著：乳酸発酵の文化譜，中央法規出版(1996)。
- 4) 堀内啓史：化学と教育，55, 546, 日本化学会化学教育協議会(2007)。
- 5) Horiuchi, H. et al.: *J. Dairy Sci.*, 92, 4112 (2009)。