

2017年3月24日

## ハイカカオチョコレート共存下における ビフィズス菌 BB536 の増殖促進作用が示されました

～日本農芸化学会 2017 年度大会（3/17～20）にて発表～

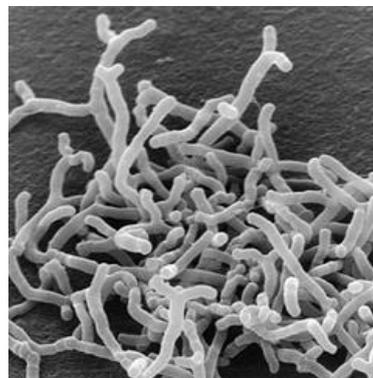
森永製菓株式会社（東京都港区芝、代表取締役社長・新井 徹）では、近年高まる健康需要を受けて、おいしさだけでなく健康効果も期待される“カカオ”に注目し、研究を進めてまいりました。

これまでもカカオから生成されるココアにおいて、『ピロリ菌殺菌効果』や『冷え症改善効果』『抗インフルエンザ効果』『口腔内衛生への応用』など、研究成果を発表しております。

この度、森永製菓では、“高カカオチョコレート（以下、ハイカカオチョコレート）”と腸内細菌の中でも善玉菌を代表する“ビフィズス菌”の組合せによる有用性について研究を行い、日本農芸化学会 2017 年度大会（2017 年 3 月 17-20 日、京都）にて研究成果を発表いたしました。

### ■ 本研究について

本研究では試験管内での実験により、“ハイカカオチョコレート”が“ビフィズス菌”に及ぼす影響について検証したところ、ハイカカオチョコレートはビフィズス菌の増殖を大幅に増加させるなど、ハイカカオチョコレートとビフィズス菌の組み合わせに有用性があることが示唆されました。



森永製菓では、今後も“ハイカカオチョコレート”と“ビフィズス菌”に関する研究を継続的に取り組んでまいりますので、ご期待ください。

## 【実験 1】

ハイカカオチョコレートのカカオ分 70%以上と定義し、このハイカカオチョコレートがビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* BB536 (以下、ビフィズス菌 BB536) の増殖に与える影響を調べるため、2種類の培養液を用意し、ビフィズス菌 BB536 の増殖と培養液の pH 変化を比較しました。

### <培養液>

培養液①: ハイカカオチョコレート入り培養液 (カカオ 70% チョコレートを 10% (w/w) 添加した牛乳)

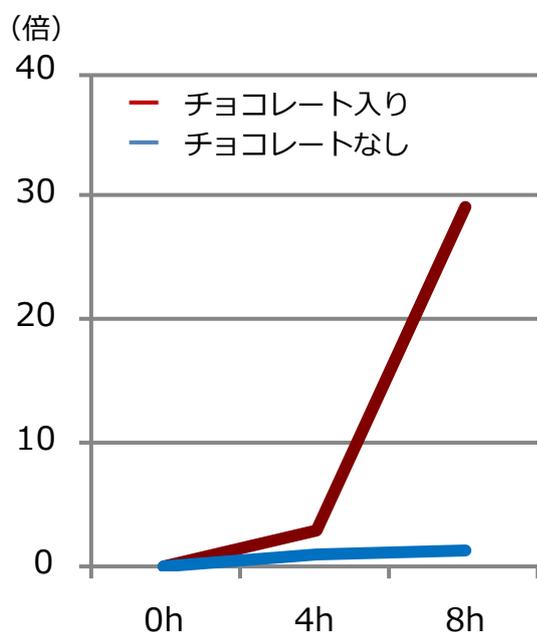
培養液②: ハイカカオチョコレートなし培養液 (牛乳のみ)

### <試験方法>

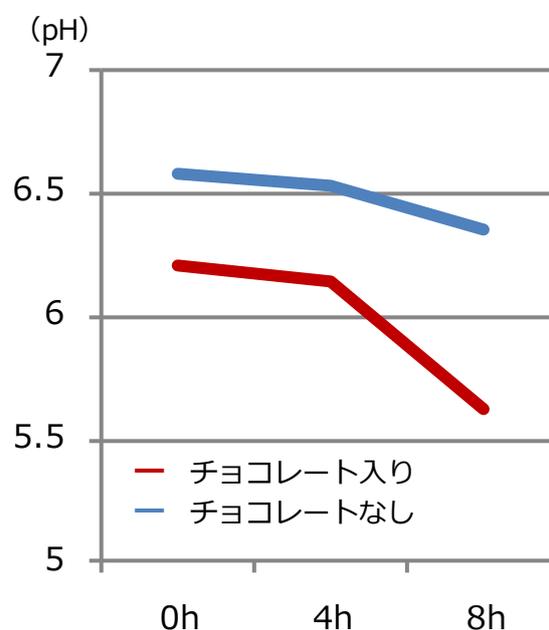
1. 別々の試験管に殺菌済みの培養液 2 種類を用意。
2. ビフィズス菌 BB536 をそれぞれの培養液に同じ数になるよう ( $2 \times 10^7$  cfu/mL) 接種。
3. 37°C で 8 時間培養し、菌数の変化と培養液の pH を測定。

### <結果>

ハイカカオチョコレートなし培養液では、ビフィズス菌の数は 1.3 倍 (8h 後) とほとんど変化しませんでした。ハイカカオチョコレート入り培養液では、ビフィズス菌 BB536 の数が 29 倍 (8h 後) に大きく増加しました。(表 1、倍数は初期接種菌数比) また、ハイカカオチョコレートなし培養液の pH は、初期値に比べ培養後 8h で 緩やかに (0.23) 低下した程度だったのに比べて、ハイカカオチョコレート入り培養液では明らかな (0.59) 低下が見られました。(表 2)



<表 1> 培養液中のビフィズス菌数の変化率



<表 2> 培養液中の pH 変化

## 【実験 2】

ハイカカオチョコレートがビフィズス菌と常在大腸菌の増殖に与える影響を調べるため、ビフィズス菌 BB536 と *Escherichia coli* NBRC102203 (以下、*E.coli*) を用意し、それぞれの増殖状況を比較しました。

### <培養液>

培養液①：ハイカカオチョコレート入り培養液（カカオ 70% チョコレートを 10% (w/w) 添加した緩衝ペプトン水 (以下、BPW))

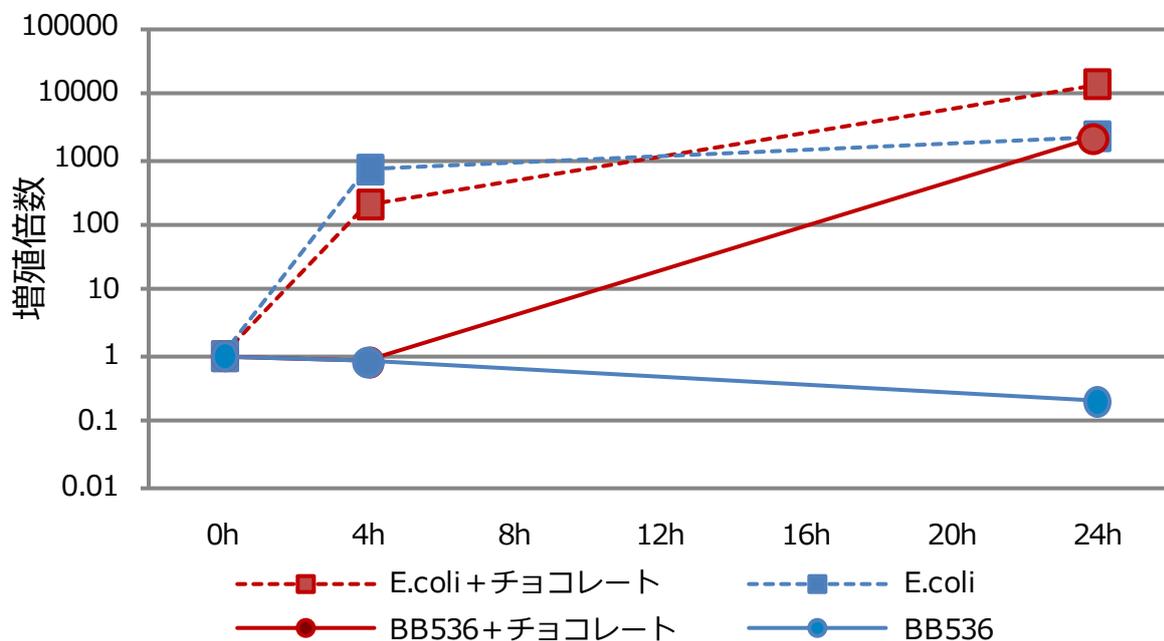
培養液②：ハイカカオチョコレートなし培養液（リン酸緩衝液 10% (w/w) 添加 BPW)

### <試験方法>

1. 別々の試験管に殺菌済みの培養液 2 種類を用意。
2. ビフィズス菌 BB536 または *E.coli* をそれぞれの培養液に同じ数になるよう ( $10^5$ cfu/mL) 接種。
3. 37°C で 24 時間培養し、菌数の変化を BL 寒天培地上で算定。

### <結果>

ビフィズス菌 BB536 は、ハイカカオチョコレート入り培養液では、常在大腸菌に比べて約 2000 倍の増殖促進率を示しました。(表 3)



<表 3> 培養液中の菌数変化率

### 【実験 3】

ハイカカオチョコレートには、幅広い抗菌作用が報告されているカカオポリフェノールが豊富に含まれています。カカオポリフェノールのビフィズス菌 BB536 に対する影響を明確にするため、カカオ熱水抽出エキスを評価対象とし、カカオポリフェノールに感受性が確認されている腸管出血性大腸菌 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC43895（以下、O-157）とビフィズス菌 BB536 について試験管内で比較しました。

#### <反応液>

反応液（以下、熱水抽出エキス）：20%カカオ熱水抽出エキスを 10%（w/w）添加したリン酸緩衝液（以下、PBS）

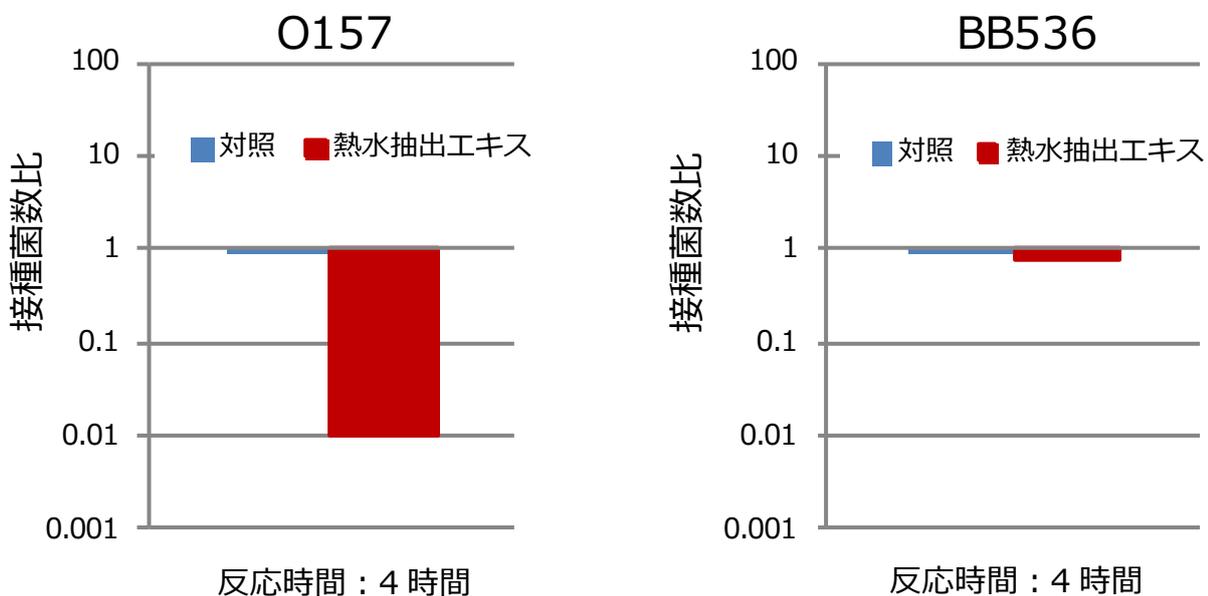
対照反応液（以下、対照）：PBS

#### <試験方法>

1. 別々の試験管に殺菌済みの反応液 2 種類を用意。
2. ビフィズス菌 BB536 または O-157 を 2 種類の反応液に接種。
3. 37°C で 4 時間培養し、生菌数の変化を BL 寒天培地上で算定。

#### <結果>

O-157 は熱水抽出液により生存菌数の大幅な低下が認められた一方で、ビフィズス菌 BB536 は熱水抽出液反応後も生存菌数がほとんど変化しませんでした。（表 4）



<表 4> *E.coli* O157:H7 とビフィズス菌 BB536 に与えるカカオ熱水抽出液の作用

### 【実験 1～3 まとめ】

ハイカカオチョコレートは、ビフィズス菌 **BB536** の増殖を大幅に増加させました。牛乳・緩衝ペプトン水と培地の条件が変わっても同様の作用が見られました。一方で、常在大腸菌への作用は 6.2 倍と、大幅に増殖させることはありませんでした。

また、ビフィズス菌 **BB536** は、ハイカカオチョコレート共存条件において、常在大腸菌に比べ約 2000 倍の増殖率を示しました。カカオポリフェノールによっても生存菌数が低下することはありませんでした。

以上のことから、ビフィズス菌とハイカカオチョコレートは組み合わせることで有用性があると考えられます。

今後も、再現性・機序・作用成分や *in vivo* でも効果が認められるかといった点などについて引き続き研究を続け、“ビフィズス菌とハイカカオチョコレートの相乗効果” について明らかにしてまいります。