

Original article

## Anti-glycative effect of yogurt: Prevention of advanced glycation end product formation

Yurie Tanaka, Masayuki Yagi, Wakako Takabe, Yoko Sakata, Yoshikazu Yonei.

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2017; 4 (1): 025-031

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文)

## ヨーグルトの蛋白糖化最終産物 (AGEs) 生成抑制作用

田中優莉絵、八木雅之、高部稚子、坂田洋子、米井嘉一

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター

### 抄録

**【目的】** ヨーグルトを対象に糖化最終産物 (AGEs) 生成阻害作用の有無を検証した。

**【方法】** 試料は市販のヨーグルト製品 12 種とした。AGEs 生成阻害作用の陽性対照にはアミノグアニジンを用いた。ヨーグルトは 20 °C、3,000 rpm で 15 分間遠心分離した後、乳清 (上清) と乳固形分 (沈殿物) に分けて試料とした。乳固形分は精製水中で超音波処理によって分散後、水抽出液を得た。AGEs 生成阻害作用はグルコース/ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) 反応系に試料を添加し、60 °C で 40 時間反応させた後の蛍光性 AGEs 量 (励起波長 370 nm、検出波長 440 nm) を測定し、AGEs 生成阻害率を算出した。AGEs の抗糖化活性は 50 % 生成阻害濃度 (IC<sub>50</sub>: mg/mL) として表した。

**【結果】** ヨーグルト 12 種のうち 9 種に抗糖化活性 (IC<sub>50</sub> < 50mg/mL) を確認した (平均 IC<sub>50</sub> 18.91 mg/mL)。ヨーグルトの AGEs 生成阻害作用は乳清中に認められ、乳固形分に認められなかった。乳清を限外濾過膜によって分画した結果、AGEs 生成阻害作用は分子量 10,000 未満の画分に強く認められた。さらに乳清の分子量 10,000 未満の画分を疎水性カートリッジカラムを用いて分画した結果、AGEs 生成阻害作用は親水性画分に認められた。

**【結論】** ヨーグルトには AGEs 生成阻害作用が認められた。AGEs 生成阻害作用成分は乳清中に存在し、分子量 10,000 未満の親水性成分である可能性があった。

**KEY WORDS:** ヨーグルト、乳酸菌、醗酵、糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs)

## はじめに

生体内における糖化とはグルコースなどの還元糖が蛋白と非酵素的に反応し、蛋白糖化最終産物 (advanced glycation end products: AGEs) の生成・蓄積に至る反応である。AGEs の生体内での生成・蓄積は糖尿病合併症などの慢性疾患や老化の進展要因となることが知られている<sup>1)</sup>。

一方、活力ある健康長寿を目指す上では、日本の伝統食を再評価し、その欠点を改め、世界の長寿地域の食習慣を学び、バランスよく食を楽しむことが大切な考え方である<sup>2)</sup>。東洋と西洋の長寿食の融合例には、日本の伝統的食材である大豆・魚・野菜・海藻などを常食しながら、西洋の長寿食の代表であるヨーグルトやチーズなどの醗酵乳製品を活用することなどがある。醗酵食品を日常的に摂取することは、疾病予防や健康増進の観点から推奨されている<sup>3-6)</sup>。

醗酵食品は食材を微生物等の働きを使って加工した食品である。食材を微生物によって醗酵させることで生まれる効能には、整腸作用や骨の強化<sup>7)</sup>、コレステロールの吸収抑制<sup>8)</sup>、抗酸化作用の強化<sup>9)</sup>などがある。これらの作用の利用は様々な健康効果や疾病の予防効果に繋がると推定されている<sup>10)</sup>。特に乳酸菌中には乳児の成長促進に寄与するポリアミン<sup>3)</sup>、環状バクテリオシンであるガセリシンA<sup>11)</sup>、NK 活性増強効果の主な活性成分 exocellular polysaccharide<sup>12)</sup> を産生するものが知られている。また近年、乳酸菌のマススクリーニング技術により、様々な機能性を付与したヨーグルトが製品化されている<sup>13-17)</sup>。これらのことからヨーグルトには、まだ知られていない機能性が存在する可能性がある。しかし生体の糖化抑制にヨーグルトが関連するとの報告はない。

本研究では、醗酵食品の中の乳製品の一種であるヨーグルトを対象に、*in vitro* グルコース / ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) 反応モデル (Glucose / HSA モデル)<sup>18)</sup> を用いて、AGEs 生成阻害作用を検証した。

## 方法

### 試料

AGEs 生成阻害作用の評価には 2013 年 5 ~ 6 月に京都府京田辺市周辺のスーパーマーケットで購入した市販のヨーグルト製品 12 種を用いた。AGEs 生成阻害作用の陽性対照物質にはアミノグアニジンを用いた (Table 1)。各ヨーグルトは均一に攪拌後、10 mL を遠心チューブに取

り、20 °C、3,000 rpm (1,210 g) で 15 分間遠心分離後、乳清 (上清) と乳固形分 (沈殿物) に分けた。得られた上清は乳清試料とした。乳固形分は 10 mL の蒸留水に再懸濁し、再び 20 °C、5,000 rpm で遠心分離して、上清を除去する操作を 3 回繰り返して乳清成分を除去した。その後、乳固形分は 10 mL の蒸留水に懸濁し、超音波ホモジナイザー (Misonix S-4000, NY, USA) を用いて Amplitude 40、Pulse-ON Time 1 秒、Pulse-OFF Time 3 秒の条件で破碎処理を 3 回行った。その後、20 °C、5,000 rpm (3,350 g) で遠心分離後に得られた上清を乳固形分抽出液試料とした。得られた各試料は 5 mL をアルミトレイに入れた後、110 °C に設定したインキュベータ内で 4 時間乾燥させて秤量した。試料溶液の固形分濃度 (mg/mL) は、秤量した乾燥前後のアルミトレイ重量から算出した。

### Glucose / HSA モデルを用いた蛋白糖化最終産物 (AGEs) 生成阻害作用の測定

0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> リン酸緩衝液 (pH 7.4)、8 mg/mL ヒト血清アルブミン (HSA) (Sigma-Aldrich, MO, USA)、0.2 mol/L グルコースを含む反応液中に、試料を 1/10 濃度になるように添加し (Glucose / HSA モデル)、60 °C で 40 時間インキュベートした。試料は原液 (1 倍) および原液を精製水で 10 倍、100 倍の 3 濃度に希釈した試料を用いた。糖化反応のコントロールには、試料の代わりに精製水を添加したものを用いた。糖化反応終了後、反応液は黒色 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 200 μL ずつ分注し、反応液の AGEs 由来蛍光 (励起波長 370 nm / 検出波長 440 nm) をマイクロプレートリーダー (Spectra ax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devise, Sunnyvale, California, USA) で測定した。測定した蛍光値は 5 μL/mL 硫酸キニーネ / 0.1 N 硫酸水溶液の蛍光値を 1,000 としたときの相対値に換算した。AGEs 生成阻害率 (%) は Glucose / HSA モデル反応液において、試料とグルコース溶液を添加した反応液 (A)、グルコース水溶液を添加しないで蒸留水と試料を添加した反応液 (B)、試料を添加しないで、グルコース溶液を添加した反応液 (C)、試料とグルコース溶液の両方を添加しない反応液 (D) の相対蛍光値を、下記の式に代入して算出した。

$$\text{AGEs 生成阻害率 (\%)} = \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

試料3濃度（固形分濃度）のAGEs生成阻害率からIC<sub>50</sub>（50%生成阻害濃度）を算出し、抗糖化活性とした。抗糖化活性はIC<sub>50</sub>値が小さいほど強いことを示す。抗糖化活性はIC<sub>50</sub>が50 mg/mL未満を活性ありと評価した。

### 限外ろ過膜による試料の分画

試料は限外ろ過膜を用いて分子量10,000以上（10K<sub>≥</sub>）と分子量10,000未満（10K<sub><</sub>）に分画した。各試料をAmicon Ultra - 0.5 mL 10 K (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)の膜上部のカップ部に450 μL入れ20°C、10,000 rpm(13,420 g)で30分間遠心分離した。膜上部のカップ部に残った残渣は450 μLの精製、水で希釈し、10K<sub>≥</sub>の分画試料とした。限外濾過膜を通過した試料溶液は10K<sub><</sub>の分画試料とした。

### 疎水性カートリッジカラムによる分画

限外ろ過膜により分画した10K<sub><</sub>の分画試料は、疎水性カートリッジカラム（Oasis HLB Plus Light Cartridge, 30 mg Sorbent per Cartridge, 30 μm Particle Size, Nihon Waters K.K., 東京都品川区）を用いて分画した。分画は予め疎水性カートリッジカラムにアセトニトリル3 mLと蒸留水3 mLを通液してコンディショニングした後、試料1.0 mLを注入し、アセトニトリル（acetonitrile : ACN）を0～50%含む精製水で1.0 mLずつ段階的に溶出した。

### 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で示した（n=3）。AGEs生成阻害率および抗糖化活性の試料間差異の検定にはTukey's testを用いた。解析結果は両側検定で危険率5%未満を有意とした。統計解析にはIMB SPSS Statics 24（IMB Japan、東京都港区）を用いた。

Table 1. Material profile.

ID	Materials	Product name	Seller / Manufacturer / Importer	Characteristics
1	Yogurt A	Koiwau Namanyu 100% Yogurt	Koiwai Dairy Products (Tokyo, Japan)	<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12
2	Yogurt B	AEON Namanyu 100% Plain Yogurt	AEON (Chiba, Japan)	<i>Lactobacteria</i> ( <i>Bifidobacteria</i> , <i>Acidophilus</i> ), <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>
3	Yogurt C	StyleONE Probiotics Yogurt LKM512 Low Fat	Kyodo Milk Industry (Tokyo, Japan)	<i>Bifidobacterium lactis</i> LKM512
4	Yogurt D	StyleONE Probiotics Yogurt LKM512	Kyodo Milk Industry	<i>Bifidobacterium lactis</i> LKM512
5	Yogurt E	Caspian Sea Yogurt Plain	Fujicco (Kobe, Japan)	<i>Streptococcus cremoris</i> FC
6	Yogurt F	Morinaga Bifidus Plain Yogurt BB536	Morinaga Milk Industry (Tokyo Japan)	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536
7	Yogurt G	Meiji Bulgaria Yogurt LB81 Plain	Meiji (Tokyo, Japan)	LB81 ( <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2038)
8	Yogurt H	Nature Megumi Plain Yogurt	Megmilk Snow Brand (Sapporo, Japan)	<i>Lactobacillus gasseri</i> SP, <i>Bifidobacteria</i> SP
9	Yogurt I	TOPVALU Bifidus Plain Yogurt	AEON	<i>Bifidobacteria</i>
10	Yogurt J	Namanyu 100% Plain Yogurt	Yasuda Yogurt (Niigata, Japan)	<i>Bifidobacterium brevis</i>
11	Yogurt K	Probiotics Plain Yogurt	AEON	<i>Bifidobacteria</i> , <i>Casei bacteria</i> , <i>Acidophilus</i>
12	Yogurt L	AEON Plain Yogurt	AEON	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
13	Positive control	Aminoguanidine	Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)	—

## 結果

### AGEs 生成阻害作用

市販のヨーグルト試料 12 種とアミノグアニジンの Glucose / HSA モデルにおける AGEs 生成阻害率と抗糖化活性 (IC<sub>50</sub>) を Fig. 1 に示した。12 種のうち D、G、I を除いた 9 種には抗糖化活性が認められた。これら 9 種の平均 IC<sub>50</sub> 値は 18.9 mg/mL で、アミノグアニジンの IC<sub>50</sub> 値の 160 分の 1 倍であった。抗糖化活性が認められた試料 9 種における抗糖化活性 (IC<sub>50</sub>) の違いは 8.2 倍 (minimum : 4.2 ~ maximum : 34.5 mg/mL) であった。

### 限外濾過膜による分画

ヨーグルト A (*Bifidobacterium lactis* BB12 由来) の乳清と乳固形分試料溶液を限外濾過膜によって、分子量 10,000 以上 (10 K ≥) と 10,000 未満 (10 K <) に分画にした時の AGEs 生成素阻害率 (%) を測定した (Table 2)。同時に由来菌の種属または菌株の異なる試料ヨーグルト C (*Bifidobacterium lactis* LKM512 由来)、ヨーグルト B (*Lactobacteria* (*Bifidobacteria*, *Acidophilus*), *Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis* 由来)、ヨーグルト J (*Bifidobacterium brevis* 由来) の乳清試料を、限外濾過膜により 10 K ≥ と 10 K < に分画にし、これら分画溶液の AGEs 生成阻害率 (%) を測定した (Table 2)。

ヨーグルト A では乳清にのみ AGEs 生成阻害作用が認められ、乳固形分抽出液にその作用が認められなかった。乳清の AGEs 生成阻害作用はヨーグルト A と同様に B、C、J の全てに認められた。これら 4 種の AGEs 生成阻害率は、10 K ≥ の分画試料と比べて 10 K < の分画試料が 4.4 ~ 13.5 倍大きかった (p < 0.01)

### 疎水性カートリッジカラムによる分画

ヨーグルト A、B、C、J の乳清を 10 K < に分画した溶液について、疎水性カートリッジカラムを用いて分画し、溶出画分ごとの AGEs 生成阻害率を測定した (Fig. 2)。4 種いずれの試料においても、精製水での溶出画分 (画分①、②) において AGEs 生成阻害作用が認められた。ヨーグルト B では ACN 5 ~ 10 % での溶出画分 (画分③~⑦) にも AGEs 生成阻害作用が認められた。

## 考察

使用した市販のヨーグルト 12 種のうち 9 種に AGEs 生成阻害作用が認められた。これらのヨーグルト製品に使用している醗酵菌の菌種や菌株には、さまざまな種類があった。しかし使用されている菌の種類と AGEs 生成阻害作

用の関連性は認められなかった。一方、ヨーグルト C と D に使用されている醗酵菌は同じ *Bifidobacterium lactis* LKM512 であったが、C にのみ抗糖化活性が認められた (C : IC<sub>50</sub> = 26.1 mg/mL, D : IC<sub>50</sub> > 50 mg/mL)。ヨーグルト C は低脂肪を訴求している製品タイプで、乳脂肪分が 1.0 % であった。一方、ヨーグルト D はノーマルタイプで乳脂肪分が 3.0 % であった。このため AGEs 生成阻害作用の差異はヨーグルトの構成成分やその含有率が関与している可能性があった。また構成成分の差異の要因には原料乳の種類の違いや製造時の醗酵条件の違いが推定された。

ヨーグルトの遠心分離上清 (乳清) と乳固形分を比較すると、乳清に強い AGEs 生成阻害作用がみられた。またヨーグルトの限外濾過膜精製画分の AGEs 生成阻害作用は、使用されている菌種の種類に関わらず 10 K < の画分に認められた。さらに乳清を疎水性カートリッジカラムにより分画した結果からは、作用成分が親水性を有することが推定された。ヨーグルトの乳清には、ラクトフェリン、αラクトアルブミン、βラクトグロブリン、牛血清アルブミン、免疫グロブリンなどの蛋白、アミノ酸、カルシウム、ビタミン類、ミネラル、乳酸菌などが含まれる<sup>19)</sup>。乳清の AGEs 生成阻害作用は 10 K < の画分に認められたことから、アミノ酸、カルシウム、ビタミン類、ミネラルなどの成分が関与している可能性が推定された。

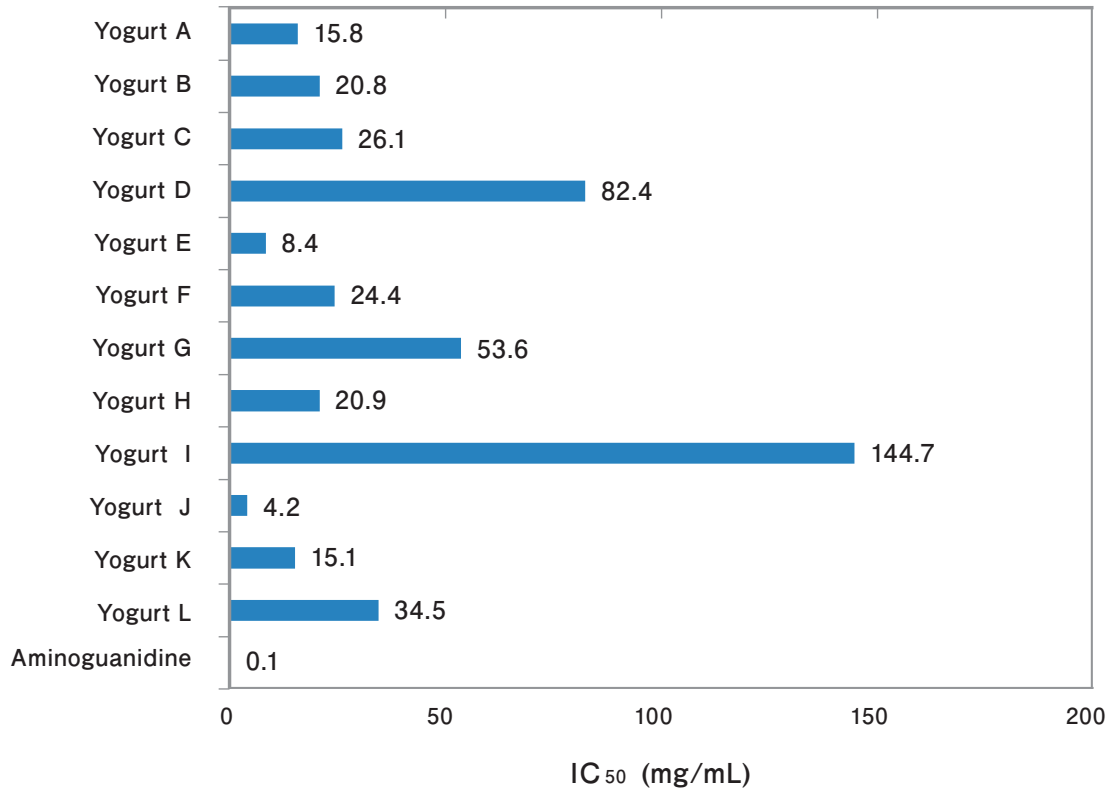
日常的なヨーグルトの摂取はカリウム、カルシウム、マグネシウム、亜鉛などのミネラル、ビタミン B2、B12 の充足とともに、中性脂肪 (トリグリセリド)、血糖、収縮時血圧、インスリン抵抗性の改善に繋がることが報告されている<sup>20)</sup>。また、2 型糖尿病患者が *Lactobacillus acidophilus* La-5 と *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 を含む乳製品を 6 週間摂取した試験では、血中の糖化マーカーであるフルクトサミン、HbA1c の低下が報告されている<sup>21)</sup>。さらに 2014 年 8 月以前に実施された 7 つの臨床試験結果のメタアナリシスでは、2 型糖尿病患者が 8 週間以上プロバイオテックスを摂取することが、血糖値や HbA1c の低下に繋がるとを示している<sup>22)</sup>。これらの臨床研究結果は、本研究で新たに確認したヨーグルトの AGEs 生成阻害作用と関連する可能性がある。

## 結論

市販のヨーグルトに AGEs 生成阻害作用を確認した。ヨーグルト中の AGEs 生成阻害作用成分は乳清に存在する分子量 10,000 未満の親水性成分である可能性が示唆された。

## 利益相反申告

本研究を遂行するにあたり利益相反に該当する事項はない。



**Fig. 1. Anti-glycative activity of yogurt and starter lactobacillus.**

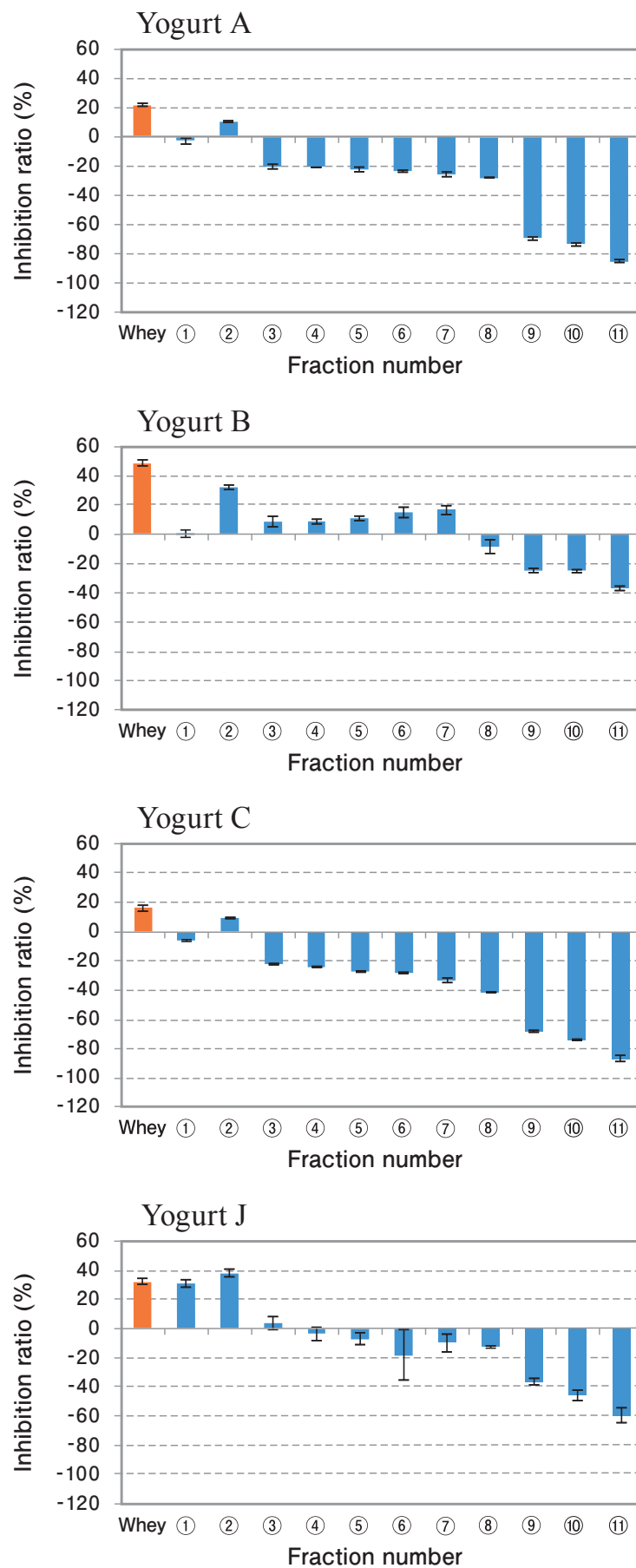
Inhibitory activity against fluorescent AGE formation (370 nm / 440 nm) in a glucose/HSA model is measured. IC<sub>50</sub> values are expressed in mg/mL. Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). AGE, advanced glycation end product; HSA, human serum albumin; IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration.

**Table 2. Percent inhibition of purified fraction by ultrafiltration membrane against fluorescent AGE formation.**

Sample name	Whey (except solid content)	MW ≥ 10,000	MW < 10,000	p value (vs MW ≥ 10,000)
Yogurt A (whey)	37.0 ± 2.8	3.1 ± 2.0	41.8 ± 2.7 *	< 0.01
(Solid content extract)	-7.8 ± 3.0	-4.2 ± 1.4	-2.9 ± 2.6	0.795
Yogurt B	42.5 ± 5.2	9.5 ± 3.7	49.7 ± 3.5 *	< 0.01
Yogurt C	41.7 ± 5.3	9.6 ± 5.1	48.4 ± 3.8 *	< 0.01
Yogurt J	52.3 ± 3.5	13.7 ± 2.7	59.8 ± 1.2 *	< 0.01

Fluorescent AGE formation (370 nm / 440 nm) in a glucose/HSA model is measured. Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). \*p < 0.05 vs fractions with MW ≥ 10,000 by Tukey's test. AGE, advanced glycation end product; HSA, human serum albumin; MW, molecular weight.





**Fig. 2.** Difference of inhibition ratio between separated fractions by hydrophobic cartridge column.

Fraction: ① - ③ Purified water; ④ - ⑤ ACN 5%; ⑥ - ⑦ ACN 10%; ⑧ - ⑨ ACN 30%; ⑩ - ⑪ A CN 50%. Fluorescent AGE formation (370 nm / 440 nm) in a glucose / HSA model is measured. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). AGEs, advanced glycation end products; ACN, acetonitrile.

## 謝辞

本研究は総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施された。

## Reference

- 1) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significant of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Med.* 2010; 7: 112-119.
- 2) Yamori Y. Longevity region in Japan and the world. *The Journal of Adult Diseases.* 2005; 35: 712-717. (in Japanese)
- 3) Matsumoto M. Intestinal bacterial metabolites and host's health. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 2005; 60: 459-467. (in Japanese)
- 4) Suzuki Y, Mashita Y, Inoue H, et al. Relationship between allergy and fermented milk intake in school children. *Arerugi.* 2008; 57: 37-45. (in Japanese)
- 5) Cherniack EP. Use of complementary and alternative medicine to treat constipation in the elderly. *Geriatr Gerontol Int.* 2013; 13: 533-538.
- 6) Komine Y, Watanabe M, Soutome T, et al. Maternal consumption of *Lactobacillus rhamnosus* GG yogurt during pregnancy promotes Bifidobacteria growth in intestinal microflora of infants. *Journal of the Medical Society of Toho University.* 2014; 61: 3-12.
- 7) Takasugi S. Effects of dairy products intake on bone metabolism. *Milk Science.* 2012; 61: 229-237. (in Japanese)
- 8) Nodake Y, Fukasawa M, Arakawa M, et al. Effects of the fermented product cultivated from soybean milk using lactic acid bacteria, PS-B1, on liver function and lipid metabolism. *Journal for the Integrated Study of Dietary Habits.* 2011; 22: 13-19. (in Japanese)
- 9) Nishiyama M, Esaki H, Mori K, et al. Preparation of a cheese-like food using soymilk, and its antioxidative property and characteristics. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi.* 2013; 60: 480-489. (in Japanese)
- 10) Messina MJ, Persky V, Satchell KDR, et al. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer.* 1994; 21: 113-131.
- 11) Guo X, Uenishi H, Kawai Y, et al. Effect of divalent metal cations on production of gassericin T by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Milk Science.* 2014; 63: 129-135.
- 12) Uemura J, Itoh T, Kaneko T, et al. Chemical characterization of exocellular polysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Milchwissenschaft.* 1998; 53: 443-446.
- 13) Tomoda T, Nakano Y, Kageyama T. Effect of yogurt and yogurt supplemented with *Bifidobacterium* and/or lactulose in healthy persons: A comparative study. *Bifidobacteria and Microflora* 1991; 10: 123-130.
- 14) Yaeshima T, Takahashi S, Matsumoto N, et al. Effect of yogurt containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency: A comparison with standard yogurt. *Bioscience and Microflora.* 1997; 16: 73-77.
- 15) Ishida H, Uenishi K, Suzuki H, et al. Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055: strain Yukijirushi) compared with yogurt: Influence on intestinal microflora and bowel habits of healthy young women. *Pharmacometrics (Öyō Yakuri).* 2001; 61: 203-213.
- 16) Nishida S, Ishikawa Y, Iino H. Effect of *Bifidobacterium lactis* DN-173010 on the intestinal transit time, the condition of defecation and intestinal microflora: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study among healthy Japanese women. *Pharmacometrics (Öyō Yakuri).* 2008; 74: 99-106.
- 17) Matsumoto M, Sakamoto M, Benno Y. Dynamics of fecal microbiota in hospitalized elderly fed probiotic LKM512 yogurt. *Microbiol Immunol.* 2009; 53: 421-432.
- 18) Hori M, Yagi M, Monoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin collagen elastin keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 125-134.
- 19) Smithers GW. Whey and whey proteins: From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal.* 2008; 18: 695-704.
- 20) Wang H, Livingston KA, Fox CS, et al. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. *Nutr Res.* 2013; 33: 18-26.
- 21) Tonucci LB, Olbrich Dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, et al. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr.* 2015 Dec 7. pii: S0261-5614(15)00331-3.
- 22) Zhang Q, Wu Y, Fei X. Effect of probiotics on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicina.* 2016; 52: 28-34.