

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580331

研究課題名（和文） 馬乳酒の微生物学的研究

研究課題名（英文） Microbiological study on fermented mare's milk

研究代表者

宮本 拓 (MIYAMOTO TAKU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：00093708

研究成果の概要（和文）：モンゴル国と中国内モンゴル自治区の遊牧民の家庭から採取した馬乳酒試料を供試し、通常の培養法と DGGE 法（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）によって乳酸菌と酵母の微生物フローラを調べた。分離した乳酸菌と酵母には双利共生作用を示すものがあり、それらを組合せたスターターは馬乳酒などのアルコール発酵乳の効率的な製造に役立つものと考えられた。また馬乳酒起源のバクテリオシン生産乳酸菌の存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We investigated the microbiota of lactic acid bacteria(LAB) and yeasts using conventional plate method and DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) analysis from fermented mare's milk, airag that was collected from different nomadic families in Mongolia and Inner Mongolia, China. Mutual symbiosis between LAB and yeast strains isolated from airag was observed. These possible positive interactions may be important for the development of LAB-yeast strains as starter cultures. We also isolated a bacteriocin-producing *Leuconostoc* strain from airag.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：馬乳酒、微生物フローラ、DGGE法、乳酸菌、酵母、共生作用、拮抗作用、モンゴル地域

1. 研究開始当初の背景

中央アジアからモンゴル高原にかけては遊牧を主体とした家畜の飼養形態が共通しており、北方遊牧民としての蒙古民族の牧畜と乳利用には注目すべきものがある。蒙古民族は、主に中国内モンゴル自治区およびモンゴル国に跨って生活している民族で、古

来から今日に至るまで遊牧の生活を受け継いでいる数少ない民族である。伝統的な蒙古民族の食生活は乳製品類を主要な食材としており、白い食べ物と呼ばれる。

家畜の種類は牛、馬、羊、山羊、駱駝などがある。多くの種類の家畜から乳を搾り、それを乳製品製造に利用しているために、加工

法は基本的に同じであっても最終製品はかなり違うものとなり、それがモンゴルの乳製品の種類の豊富さに結びついている。

これらの乳製品のうち、乳酸発酵乳製品には液状飲料のタラグ（ヨーグルト）や棒状、板状などに成形するホロト（チーズ）がある。一方、アルコール発酵（乳酸発酵も同時に進行）には馬、牛、駱駝などの乳が使われ、樽桶などの容器（古くは皮袋を使用）内で攪拌通気すると酵母の働きでドブロクのような乳酒（アイラグ）ができる。馬の乳から作る馬乳酒は直接飲用されるもので、チゲーもしくはグン・アイラグと呼ばれる。

馬乳の栄養成分は牛乳などの反芻動物の乳に比べて大きく異なり、乳タンパク質や乳脂肪含量が低く、人間の乳にとっても類似している。馬乳は牛乳以上のビタミンCを含み、発酵に関与する微生物によりビタミンCがさらに生成され、馬乳酒の含量は牛乳の5~6倍（約9.8~13.8mg/100ml）になるという。馬乳酒は野菜の摂取が少ない遊牧民にとって、夏季の貴重なビタミンC補給源である。

馬乳酒による療法は、モンゴル飲膳療法のなかで重要な位置を占める独特なものであり、十三世紀に名をはせた療法である。ヨーロッパの著名な旅行家であるウィリアム・ルブルクはその“モンゴル旅行記”に、「クームスはモンゴルやアジア遊牧民の飲みなれた飲料であり、栄養に富み、肺病を治す効果がある」と記している。中国内蒙古自治区のシリングル盟にあるモンゴル医学研究所では、主に馬乳酒治療の研究を行い、“酸馬乳療法”と題する馬乳酒治療を述べた専門書（1986）に、馬乳酒は高血圧、痛風、心臓病、肺結核、胃炎、胃潰瘍、結腸炎、結核性腹膜炎、細菌性赤痢、糖尿病、神経衰弱、神経性頭痛、肺気腫などの病気に効果があるという。

馬乳酒には乳酸菌と酵母が主に含まれて

おり、乳酸菌による乳酸発酵と酵母によるアルコール発酵が重要な部分を占めている。乳酸発酵とアルコール発酵による代謝産物が馬乳酒の独特な風味に影響を与えている。また、発酵過程で生産された酸および抗菌物質は、最終製品における微生物学的な安全性と製品における保存性を高めることになる。

本研究で取り上げたアルコール性乳酸発酵飲料である馬乳酒の栄養的特徴と保健効果および独特な風味と保存性は、含まれる微生物フローラと深く関係があると考えられ、新しい知見が期待される。

2. 研究の目的

伝統的な発酵食品は長い年月をかけて複数の微生物からなる安定なフローラ（菌叢）が構築されている場合が多い。そのフローラは微生物同士が共生と拮抗を経て安定的なフローラを確立したものと考える。伝統的な発酵食品のフローラを詳細に把握することは、その発酵食品を安定的に製造、あるいは商業的に生産する際の微生物制御において重要となる。

従来、微生物フローラの調査では、サンプルを均質化後、段階的に希釈したサンプル液を寒天培地で培養する手法（培養法）が行われてきた。この手法では検出されたコロニーを釣菌し、単一菌株での培養が可能となるため、その菌株固有の特性を調べることができるといったメリットが存在する一方で、希釈段階の低いプレートで優勢な菌株にかくれてしまうマイナーな菌株は、発酵食品の風味や組織形成には不可欠であるにもかかわらず、検出が困難になるというデメリットがある。

近年になって、サンプルを培養することなくDNAからフローラを解析する手法が考案されている。この手法では通常の培養方法では

生育が観察されない難培養微生物の検出が可能になる。そして培養法に比べマイナー菌の解析能力が高いといったメリットが存在する一方、死菌も検出するという問題点や、菌株を分離培養しないため菌株特性が把握できないといったデメリットがある。このDNAを用いた解析手法のなかで DGGE 法(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)は DNA 断片の 1 塩基の違いを検出する能力があり、未知のフローラを解析するのに適した手法といえる。

本研究では、従来法に加えて DGGE 法を併用することによって馬乳酒を構成する微生物フローラの調査と構成菌種間の共生や拮抗作用の解析をするとともに、構成微生物の有用機能の解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 培養法による乳酸菌フローラの解析

モンゴル地域(モンゴル国と中国内蒙古自治区)で採取した 10 種類の馬乳酒を供試した。空輸後、当研究室で分離した。

① 乳酸菌の分離

分離培地は BCP 加プレートカウント寒天培地および MRS 寒天培地を用い、酵母の生育を抑えるためにシクロヘキシミドを分離培地へ添加しておく。中温性乳酸菌と高温性乳酸菌を分離するため、培養温度は 25℃と 37℃とする。

② 乳酸菌の同定

培養法によって分離した菌株はグラム染色、生育温度試験、耐塩性試験、初発 pH 試験、乳酸旋光性、グルコースからのガス産生試験、API50CHL システムによる糖類資化性試験を実施し、「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」に従って同定する。

この表現型による同定結果の確認として、遺伝型による同定も行う。すなわち、16SrDNA の配列を分析し、Web 上のデータベースと相

同性検索することで菌種を決定する。

(2) DGGE 法による乳酸菌フローラの解析

上記のサンプルから直接 DNA を抽出し、16SrDNA の V3 領域(菌種によって異なる配列をもつ部位)200bp を PCR によって増幅する。増幅する際、DNA の 5' 末端に GC クランプ(変性しにくい DNA 配列をもつ部位)を結合させておく。この PCR 産物を変性剤の存在下で電気泳動すると変性して 1 本鎖となるが、GC クランプでつながった 400bp の 1 本鎖となる。DNA 配列が異なると変性を誘発する変性剤濃度に差がでるため、配列の異なる DNA は電気泳動で移動距離の異なるバンドを形成する。この移動距離を既知の菌種と比較し同定する。既知の菌種と移動距離の異なるバンドについてはゲルから切り出しその配列を分析し、Web 上のデータベースと相同性検索することで菌種を決定する。

(3) 酵母フローラの解析

① 酵母の分離

分離培地は YM 寒天培地を用い、培養法により実施する。細菌の生育を抑える目的で、寒天培地にクロラムフェニコールを添加しておく。25℃と 37℃で 3~5 日間培養し、形成したコロニーを形態(色沢、大きさ、形状)の違いをもとに釣菌と純化をする。

③ 酵母の同定

分離した菌株は、栄養細胞の形態観察、液体培地と寒天培地での生育性、菌糸・偽菌糸・厚膜胞子の観察、子嚢胞子の形態観察、糖類発酵性、炭素源資化性、硝酸塩資化性、ビタミン欠培地での生育性、37℃での生育性、50%グルコース培地での耐浸透圧性、100ppm シクロヘキシミドに対する抵抗性、API ID32C での再確認試験を実施し、「The yeasts, a Taxonomic Study」に従って同定する。

(4) 分離菌株の性状把握と商業的利用に向けた基礎的な研究

培養法によって分離した菌株が発酵食品のなかで担う機能と役割を把握するため、共生作用や抗菌作用について調査する。

4. 研究成果

(1) モンゴル地域の馬乳酒における乳酸菌と酵母の分布について

モンゴル国と中国内モンゴル自治区の異なった家庭の10種類の馬乳酒試料からそれぞれ113株と141株の乳酸菌合計254株を分離し、それらの形態学的、生理生化学的性状ならびに16SrDNAの相同性をもとに同定した。モンゴル国試料では乳酸球菌5種34株と乳酸桿菌6種79株、また中国内モンゴル自治区試料では乳酸球菌5種94株と乳酸桿菌2種47株であった。

図1に示したように、モンゴル国馬乳酒試料において、優勢に分離された乳酸菌種は *Lactococcus(Lc.) lactis* subsp. *lactis*(15.9%) と *Lactobacillus(Lb.) curvatus* (33.6%) であり、その他にも *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (19.5%)、*Lb. brevis* (14.2%) および *Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* subsp. *dextranicum* (9.7%) などが分離された。一方、少数ではあるが高温性のホモ発酵型である *Streptococcus thermophiles* (0.9%)、*Lb. acidophilus* (0.9%) および高温性ヘテロ発酵型の *Lb. fermentum*(0.9%) も含まれていた。

中国内モンゴル自治区の7つの馬乳酒試料において、優勢に分離された菌種は *Lc. lactis* subsp. *lactis* (42.6%) と *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (31.9%) であった。その他にもヘテロ発酵型乳酸菌である *Leuc. lactis* (9.9%)、*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (8.5%)、*Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (3.5%) も分離された。馬乳酒試料全体でみると中温性のホモ発酵

型およびヘテロ型の乳酸菌株が主に分離され、以前の馬乳酒についての報告と同様の結果であった(那日松ら1996;水谷ら1997;渡部ら1998;布仁特古斯ら2002)。しかしながら、モンゴル国試料から高温性の菌株が少数に分離されており、乳製品製造時の温度やモンゴル国の夏季における乾燥した気候が関係していると考えられる。遊牧民は馬乳酒とその他の伝統的発酵乳製品の製造に同一の製造器具を使用すること、自家製乳製品をお土産にする習慣、家畜の輪環放牧をすることにより乳酸菌種の交換が自然に行われ、結果として各乳製品で同じ乳酸菌構成になる可能性のあることが報告されている(布仁特古斯ら2002)。

以上の培養法による結果に対し、DGGE法で調べた優勢な乳酸菌種としては *Lc. lactis* subsp. *lactis*、*Leuc. mesenteroides*、*Lb. helveticus*、*Lb. kefiranofaciens* などが多くの試料で検出された。

馬乳酒の発酵状態によって球菌が主要なフローラを占めるサンプルと桿菌が主要なフローラを占めるサンプルがあり、発酵の進んだサンプルでは桿菌が多く検出されるが、実際の発酵工程では球菌も多く関与していることが示唆された。

一方、酵母菌種としては乳糖発酵性の *Candida kefir*、*Kluyveromyces marxianus* および乳糖非発酵性の *Saccharomyces cerevisiae* などが分離された。

(2) 馬乳酒から分離した乳酸菌と酵母における微生物間相互作用について

馬乳酒から分離した乳酸菌と酵母の微生物間相互作用を検討したところ、*Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* subsp. *dextranicum* 6B2081と *Saccharomyces cerevisiae* 4Cあるいは *Candida kefir* 2Y305の間で双利共生作用認められた(表1)。すなわち、脱脂乳培地中での糖含量の変化を調べたところ、乳酸菌

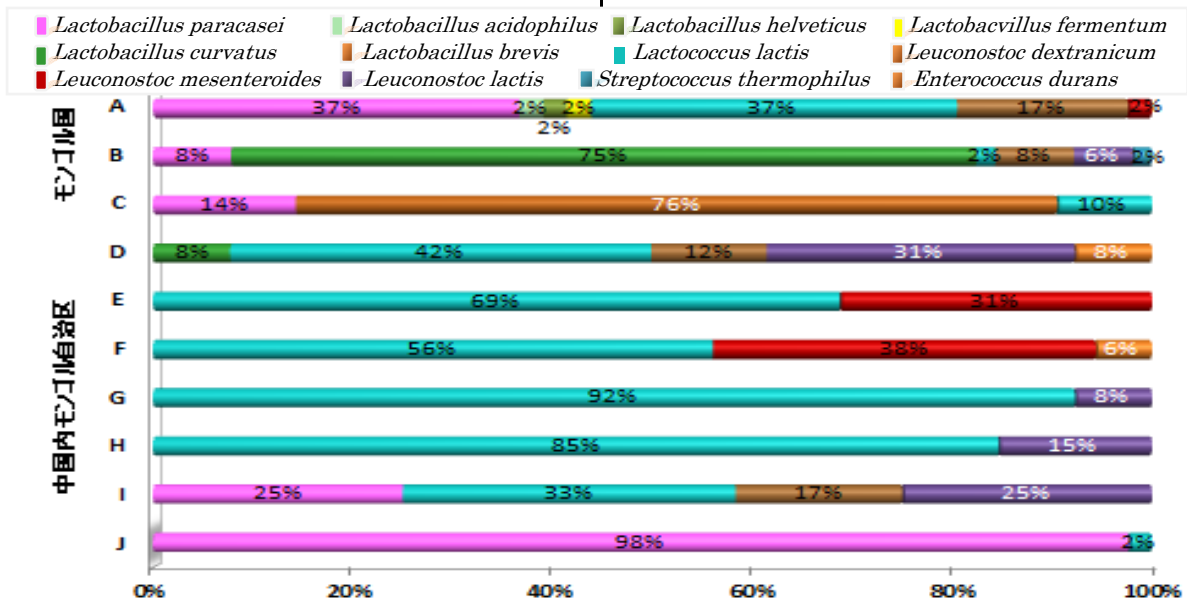


図1 馬乳酒における乳酸菌分布

乳酸菌の生産するグルコースとガラクトースを酵母が利用していた。一方、酵母が生産するペプチドなどを乳酸菌が利用していることが観察されたことから、乳酸菌と酵母の単独培養に比べ、混合培養において、酸生成およびアルコール生成が高まるものと推定された。

双利共生作用のある乳酸菌と酵母を組合せたスターターは馬乳酒などのアルコール発酵乳の効率的な製造に有効であると考えられた。

表1 馬乳酒に由来する乳酸菌と酵母の微生物間相互作用

乳酸菌	乳糖非発酵性酵母	乳糖発酵性酵母
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4C	<i>Candida kefyr</i> 2F305
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> 6E2981	双利共生	双利共生
<i>Lactobacillus reuteri</i> 940B3	拮抗	拮抗
<i>Lactobacillus helveticus</i> 130B4	偏利共生	偏利共生

(3) 馬乳酒から分離した乳酸菌の抗菌活性について

Listeria monocytogenes VTU206を指標菌として、馬乳酒から分離した乳酸菌254株の抗菌活性を寒天平板拡散法によって調べたところ、抗菌活性の最も強かった406株をスクリーニングした。406株の生理生化学的性状ならび

に 16SrDNA の塩基配列の相同性により *Leuconostoc(Leuc.) mesenteroides* subsp. *mesenteroides* と同定した。406株は *Listeria monocytogenes*、*Clostridium botulinum* などの食品汚染菌あるいは食中毒菌などに対して抗菌活性を示した以外に、いくつかの乳酸菌に対して抗菌活性が認められた。

Leuc. mesenteroides subsp. *mesenteroides* 406において、MRS 液体培地を用い、抗菌活性、pH および生育の経時的変化を調べたところ、抗菌活性は培養 6 時間から検出され、定常期である 24-36 時間で最高値 (4,000 AU/mL) に達し、生産する抗菌物質がペプシンなどのタンパク質分解酵素処理で失活する熱安定性を示すバクテリオシンであった。そのバクテリオシンの分子量を SDS-PAGE によって推定したところ約 3,300Da であり、従来報告された *Leuconostoc mesenteroides* の生産するバクテリオシンと比較すると分子量は異なっていた。

以上のように、馬乳酒起源のバクテリオシン生産乳酸菌の存在を明らかにした。今後、406 株の生産するバクテリオシンの構造を解明するとともに、スターター乳酸菌としての

応用研究が望まれる。

分離した乳酸菌にはプロバイオティック効果のあるGABA高生産菌も含まれており、馬乳酒は生理機能に優れた新規乳酸菌の宝庫であることが示唆された。今後、それらを用いた機能性発酵食品の創製が期待される。

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6件)

- ① Sudan, Wulijideligen, Arakawa, K., Miyamoto, M. and Miyamoto, T.: Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk. *Animal Science Journal*, 査読有, 83, 2012, in press
- ② Wulijideligen, Asahina, T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H. and Miyamoto, T.: Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag. *Animal Science Journal*, 査読有, 83, 2012, doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01010.x
- ③ Sudan, Wulijideligen and Miyamoto, T.: Screening and identification of lactic acid bacteria from airag for antifungal activity. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 査読有, 10, 2011, 2751-2757
- ④ Sudan, Baiyu, Shuangquan, Wulijideligen and Miyamoto, T.: Isolation and identification of yeasts in chigee, fermented mare's milk, a traditional drink of Inner Mongolia, China. *Milk Science*, 査読有, 59, 2010, 231-236
- ⑤ Miyamoto, M., Seto, Y., Nakajima, H., Burenjargal, S., Gombojav, A., Demberel, S. and Miyamoto, T.: Denaturing gradient gel

electrophoresis analysis of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Mongolian fermented milk. *Food Science and Technology Research*, 査読有, 16, 2010, 319-326

[学会発表] (計6件)

- ① Bolormaa, T. 他4名、モンゴル国アイラグの微生物フローラについて、日本畜産学会第115回大会、2012年3月29日、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)
- ② 宮本 拓、乳酸菌の機能性探索と利用に関する研究、中国四国農林水産・食品先進技術研究会、2011年12月16日、岡山コンベンションセンター(岡山市)
- ③ 池田裕美 他5名、馬乳酒起源乳酸菌における生理機能の探索について、平成23年度酪農科学シンポジウム、2011年9月22日、フォレスト仙台(仙台市)
- ④ 蘇 敦 他3名、アルコール発酵乳アイラグを構成する乳酸菌と酵母の共生作用について、平成23年度酪農科学シンポジウム、2011年9月22日、フォレスト仙台(仙台市)
- ⑤ 宮本真理 他7名、モンゴル国の馬乳酒〜とくに乳酸菌フローラについて〜、日本モンゴル学会、2009年11月21日、岡山大学50周年記念館(岡山市)

[図書] (計1件)

宮本 拓、朝倉書店、ミルクの事典、2009、282-283

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 拓 (MIYAMOTO TAKU)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 00093708