

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 4 日現在

機関番号：35304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450408

研究課題名(和文) アルコール発酵乳における乳酸菌と酵母の微生物間相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Microbial interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, Mongolian alcoholic fermented milk

研究代表者

宮本 拓 (MIYAMOTO, TAKU)

くらしき作陽大学・食文化学部・教授

研究者番号：00093708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：モンゴル地域の伝統的なアルコール発酵乳アイラグを構成する乳酸菌と酵母の相互作用を検討した。乳酸菌と酵母を単独あるいは混合培養した結果、*Leuconostoc mesenteroides* 6B2081は酵母の生育を促進し、*Candida kefyr* 2Y305 と *Saccharomyces cerevisiae* 4Cは乳酸菌の生育を促進した。一方で、リステリア菌などの生育を抑制するバクテリオシン生産性 *Leuc. mesenteroides* も存在していた。本研究で得られた共生的あるいは拮抗的相互作用を示す乳酸菌と酵母の組合せは、新規なアルコール発酵乳の開発において、有益な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：The aims of this work are to elucidate the interactions between lactic acid bacteria(LAB) and yeasts which are representative microorganisms from airag, a traditional alcoholic fermented milk in Mongolia. Both LAB and yeasts showed stimulatory and inhibitory effects on each other depending on the combination. *Leuconostoc mesenteroides* 6B2081 was stimulated in mixed cultures with yeasts used. *Candida kefyr* 2Y305 and *Saccharomyces cerevisiae* 4C were evidently enhanced in mixed cultures with LAB compared to their single culture. Meanwhile, a bacteriocin-producing strain of *Leuc. mesenteroides* was also isolated from airag. The bacteriocin inhibited the growth of food spoilage and pathogenic organisms, including *Listeria monocytogenes*. These symbiotic and antagonistic interactions may be important for the development of LAB-yeast strains as starter cultures for the beneficial alcoholic fermented milk.

研究分野：農学

キーワード：アルコール発酵乳 アイラグ 微生物フローラ 乳酸菌 酵母 微生物間相互作用 共生作用 拮抗作用

## 1. 研究開始当初の背景

中江(1976)、梅棹(1990)、小長谷(1992)、越智(1997)、水谷ら(1997)、高橋(2000)そして筆者らの現地調査(2002)に基づくモンゴル(外モンゴルと内モンゴル)の乳加工体系によれば、モンゴルの乳製品には30種類以上の名前が知られている。いずれもスー(生乳)を出発点とするが、乳酸発酵あるいはアルコール発酵の場合はボルソン・スー(脱脂乳)やエードスン・スー(脱脂酸乳)を原料にすることもある。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ート(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。

馬乳酒を始めとするアルコール発酵乳アイラグ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アイラグ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。さらに、アイラグの発酵中にビタミンB群などの代謝産物を生産するという報告も見られる。その他に、馬乳酒のミコバクテリウム結核に対する抗菌作用がロシアで報告されている。

筆者らは科学研究費補助金等によりアイラグなどのモンゴル原産発酵乳製品の微生物学的特徴を調査してきた。その過程で乳酸菌の探索・収集・利用に関する研究も実施してきた。特に過去3年間の「馬乳酒の微生物学的研究」(基盤研究C(一般)、平成21年度~平成23年度)では、従来のプレート法に加えDGGE法(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)を併用することによって馬乳酒を構成する乳酸菌と酵母の微生物フローラを網羅的に解析した。その結果、DGGE法では発酵後期に死滅してしまう乳酸球菌や酵母も検出でき、アイラグの発酵に関わる微生物をより詳細に明らかにすることができた。

## 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や生理機能の確立において重要となる。伝統乳酸発酵食品における乳酸菌の役割として、食品中のpHを乳酸によって低下させ、他の微生物を排除することは良く知られた事実である。また、過酸化水素やバクテリオシンといった抗菌作用を有する物質を生産し、他の微生物だけではなく、他の乳酸菌も抑制することも知られている。一方で、アルコール発酵乳に含まれる乳酸菌や酵母のように、発酵食品内で単菌株では増殖が出来ないあるいは遅い乳酸菌や酵母の生育を、他の乳酸菌や酵母が助けるという「協力関係」が存在していることも明らかにされている。長い年月をかけて、伝統乳酸発酵食品が受け継がれてきた製造方法、人々、環境、文化による「選択圧」によって確立された微生物フローラ同士の関係には我々には未知の共存関係が隠されている可能性が高いのではないだろうか。

本研究では、アルコール発酵乳を構成する微生物の相互作用を調べ、共生作用あるいは拮抗作用の見られた乳酸菌と酵母について詳細な微生物学的特徴を明らかにする。また、特徴の見られた菌種・菌株を用いて、アルコール発酵乳の効率的な製造技術を考察する。これらの研究によって、有用菌株を用いた機能性発酵食品の創製が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1)プレート法による乳酸菌フローラの解析法

#### 1)乳酸菌の分離

乳酸菌の分離には、BCP加プレートカウント寒天培地(日水製)とMRS寒天培地(Merck製)の2種類の培地を用いた。通常の混釈培養法に加えて増菌培養法を行った。すなわち、アイラグ(馬乳酒、牛乳酒、駱駝乳酒)試料

をリトマスミルク培地に接種して、高温性乳酸菌と中温性乳酸菌を分離するため、20、30 および 40°C で増菌培養後、常法に従って段階希釈した。この希釈液を各培地と混釈後、同様の 20、30 および 40°C で培養した。BCP 加プレートカウント寒天培地では 3 日間、MRS 寒天培地では 5 日間培養したのち、形成されたコロニーが 30 個以下の各平板より、形態の異なるコロニーを釣菌して、純化した。純粹分離した乳酸菌株は脱脂乳培地で冷凍保存した。なお、好気性細菌の生育を抑制するため嫌氣的に培養するか、抗生物質（シクロヘキシミド）や代謝阻害物質（アジ化ナトリウム）を分離培地へ添加しておく。BCP 加プレートカウント寒天培地では乳酸を生成して培地を黄変させるコロニーをコロニー形態の違いをもとに分離する。

## 2) 分離菌株の同定

プレート法によって分離した菌株はグラム染色と形態観察、カタラーゼ試験および酵母エキスとグルコース（それぞれ 0.5%）含有リトマスミルクの変化を調べ、グラム陽性でカタラーゼ陰性の酸を生成する菌株を、形態観察の結果から乳酸球菌あるいは乳酸桿菌に分けた。乳酸球菌の場合は 10°C と 45°C での生育性、乳酸桿菌の場合は 15°C と 45°C での生育性を調べ、それぞれについてホモとヘテロ発酵型式の識別ならびに生成乳酸の旋光性を調べることによって菌属に分類した。さらに、糖類発酵性、L-アルギニンよりアンモニアの生成、馬尿酸ナトリウムの分解性および pH9.6 と 6.5% 食塩に対する耐性などを調べ、アピ 50CHL 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 スペーサー領域の菌種特異的プライマーがすでに設計されている菌種については、そのプライマーを用いて PCR することで得られる DNA 断片の大きさから菌種を確認する。また、プライマーが設計されていない菌種については、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法

伝統的な発酵食品の乳酸菌フローラを DNA を用いて詳細に解析することを目的とし、これまで報告の少ないモンゴルの伝統的な発酵乳飲料である馬乳酒をサンプルとして供試する。

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。このなかには、これまで報告のない新しい菌種として提案できる株の存在も期待できる。

## (3) 酵母フローラの解析法

### 1) 酵母の分離

分離培地は YM 寒天培地を用い、プレート法により実施する。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°C と 37°C 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。

### 2) 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°C 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. 研究成果

### (1)アイラグの微生物フローラ

クーマスは馬乳を原料として製造されるアルコール発酵乳である。アルコール発酵した乳酒をモンゴルではアイラグ(airag)と呼ぶ。そのうち、馬乳のアイラグ(馬乳酒)をチゲー(chigee)もしくはグン・アイラグ(gun airag)、そして駱駝乳のアイラグ(駱駝乳酒)をインギン・アイラグ(engin airag)もしくはホゴрмаグ(hogormag)と呼んでいる。アルヒ(aruhi)は牛乳のアイラグ(牛乳酒)を蒸留して作る蒸留酒である。

クーマスの微生物フローラについてはRobinsonら(2002)によって報告されており、乳酸桿菌、乳糖発酵性酵母、乳糖非発酵性酵母、*Lactococcus*属菌種の存在が示唆されている。一方、アイラグおよびアイラグの種菌となるフルングに関する微生物フローラは、日本や中国、モンゴルの研究者によって調査されている。共通性の高いものとして、*Lactococcus lactis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Enterococcus*属菌種などの乳酸球菌と*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus paracasei*などの乳酸桿菌を含む。馬乳酒、駱駝乳酒およびそれらの種菌フルングには上述の乳酸菌に加えて、*Candida kefyr*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*などの乳糖発酵性あるいは乳糖非発酵性の酵母を含む。その他に検出される乳酸菌として、*Lactobacillus helveticus*が比較的共通性の高い菌種である。

馬乳酒などのアイラグに優勢な乳酸菌種としては*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus helveticus*、*Lb. kefirianofaciens*などが多くの試料で検出された。アイラグ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 kefyr*、*Kluyveromyces marxianus*および乳糖非発酵性の*Saccharomyces cerevisiae*などが分離された。

また、馬乳酒アイラグから分離した乳酸菌のうち、16SrDNA シーケンスを用いて *Lb. helveticus* であることを確認した菌株について、10%還元脱脂乳中で35℃、16時間と72時間培養後の到達酸度を比較したところ、一部の菌株で、35℃における乳での生育が基準株や乳製品製造で使用されている株に比べて著しく遅いものが散見された。以上より、アイラグの乳酸菌フローラには、乳において35℃での生育の遅い菌株が一定数で存在していることが明らかとなった。我々が見出した「遅生酸性」*Lb. helveticus* の存在は、ヨーロッパから東アジアまでの乳文化圏での乳製造技術が伝播する中で、製造技術の重要な要素である乳酸菌がどのように伝播したか、また、乳の発酵に関与する遺伝子がどのような形で選択・進化されてきたかについての研究は今後の大きな課題である。

以上のように、アイラグに含まれる乳酸菌については、採取場所や発酵日数などの製造環境の相違により、構成菌種にも違いがみられた。また、アイラグの製造方法や微生物フローラは、モンゴル人の生活習慣と深い係わりがあり、草原の植物と放牧家畜に由来する微生物などにも影響されるところが大きいと考えられる。すなわち、モンゴルの遊牧民たちは、家畜を同じ草地で輪環放牧しており、また、自家製の乳製品をお土産にしたり、フルングと呼ばれるスターター用種菌をお互いに借りるなどの習慣がある。これらの要因で、アイラグに含まれる乳酸菌種と伝統的発酵乳類から分離される乳酸菌種との間に類似性がみられたと思われる。

### (2)アイラグから分離した乳酸菌と酵母における微生物間相互作用

アイラグはモンゴル族の伝統的なアルコール発酵乳であり、馬乳、牛乳、ラクダ乳などを乳酸菌と酵母の働きにより自然発酵させて製造され、独特な乳飲料として古来からモンゴル族の遊牧民に愛飲されている。アイラグの製造においては自然環境に由来する多種類の乳酸菌や酵母が共生、拮抗を繰り返しながら一定のフローラを形成していると考えられ、含まれる乳酸菌と酵母の共生関係を明らかにすることはアイラグの製造技術を研究する上

で重要である。

図1に示すように、アイラグに由来する乳酸菌9株と酵母5株を用いて微生物間相互作用を検討した。それらの菌株のうち、乳酸菌3株と酵母2株を選択し、共生関係を調べたところ、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 6B2081と*Saccharomyces cerevisiae* 4Cあるいは*Candida kefyr* 2Y305の間では双利共生作用が認められた。還元脱脂乳培地での糖含量の変化を測定した結果、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ることがわかった。

次に、酵母の生産する乳酸菌の生育促進物質について検討した。乳糖発酵性酵母*Candida kefyr* 2Y305で7日間単独培養した還元脱脂乳培地からホエーを調製し、乳酸菌6B2081株の生育に及ぼす影響を調べたところ、菌無添加の対照に比べ、2Y305株からの調製ホエーを添加した還元脱脂乳では滴定酸度が明らかに上昇し、乳酸菌数も4日目以降で高い値を示していた。酵母2Y305株を還元脱脂乳培地で一週間培養後、pH4.6に調整し、遠心分離によって得たホエーに9倍量のエタノールを加えて分画し、エタノール可溶性画分および不溶性画分をそれぞれトリプトンおよびグルコースなどを含むTG液体培地に添加し、乳酸菌に対する生育促進効果を調べた結果、エタノール不溶性画分において生育促進効果が見られた。さらに、酵母2Y305株の単独および乳酸菌6B2081株との混合培養による調製ホエーからのエタノール不溶性画分をゲルろ過法(セファデックス G25)および逆相HPLC法(コスモシル 5C18-AR-300)によって生育促進物質の精製を試みた結果、単独培養と比較すると混合培養では明らかに減少したペプチド画分が認められ、これらのペプチド画分が乳酸菌の生育に有効なものと推定された。HPLCのクロマトグラムから各画分を回収し、TG液体培地に加え、乳酸菌の生育に及ぼす影響を検討した結果、TG液体培地において高い生育促進効果を示す画分があった。

一方で、アイラグから分離した乳酸菌の抗菌活性を寒天平板拡散法によって調べたところ、抗菌活性が強かった *Leuconostoc*

*mesenteroides* の406株および213M0株をスクリーニングした。そのうち、406株は *Listeria monocytogenes* , *Clostridium botulinum* などの食品汚染菌あるいは食中毒菌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見られた。406株において、MRS液体培地を用い、抗菌活性、pHおよび生育の経時的变化を調べたところ、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)に達した。培養36時間から低下したが、72時間まで抗菌活性があった。また、406株の抗菌活性に及ぼすpH、酵素処理および熱処理の影響を調べたところ、抗菌活性はpH4-7において安定であり、pHが高くなるにつれて、抗菌活性が低下し、pH12では失活した。いくつかのタンパク質分解酵素処理では抗菌活性が失われたが、カタラーゼ処理では失活しなかった。またpH6.0の条件下で、熱安定性を示した。これらの結果から406株の生産する抗菌物質は抗リステリア活性を持つクラスIIaのバクテリオシンであると考えられた。次に、406株をMRS液体培地で25°C24時間培養後、上清液の80%硫酸アンモニウム沈殿画分について、そのSDS-PAGEにより、バクテリオシンの分子量を推定したところ、406株の生産するバクテリオシンは約3,300ダルトンであった。このバクテリオシンの分子量は従来の報告とは異なっていた。

以上のように、本研究ではモンゴル地域の伝統的アルコール発酵乳アイラグにおける乳酸菌と酵母の共生作用をはじめ明らかにするとともに、抗菌物質生産性乳酸菌を単離した。すなわち、アイラグの製造過程で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役割を果たし、構成微生物の間では、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すると共に、酵母の生産するペプチドなどを乳酸菌が利用し、双利共生作用の見られることが示唆された。また、食品汚染微生物に対して拮抗作用を有する乳酸菌は食品の安全性に有効である。これらの知見はアイラグの製造技術を改良する上で有意義な情報となる。今後、共生微生物や抗菌活性を示す乳酸菌などをスターターとした新た

なアルコール発酵乳への応用研究が望まれる。

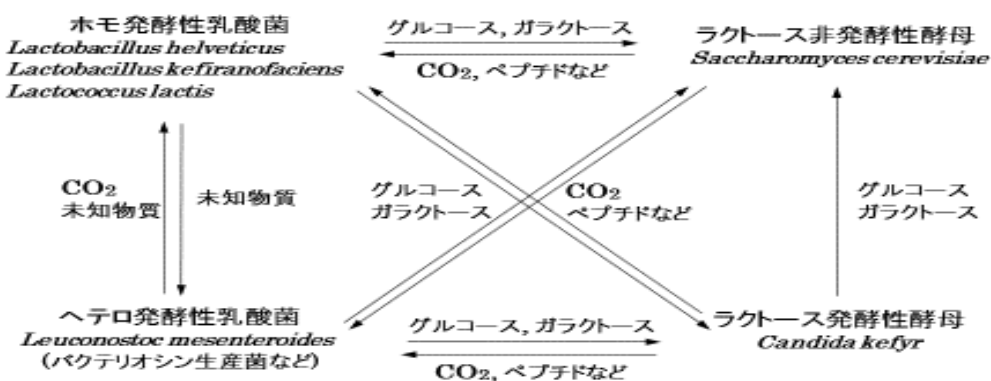


図1 アルコール発酵乳アイラグにおける微生物間の相互関連 (推定)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① 宮本 拓・烏力吉徳力根・松永佳奈子：モンゴルの馬乳酒アイラグの伝統製法と微生物学的特徴，日本醸造協会誌，印刷中 (2017) 査読有
- ② Kensuke ARAKAWA, Saki YOSHIDA, Hiroki AIKAWA, Chihiro HANO, Tsognemekh BOLORMAA, Sedkhuu BURENJARGAL and Taku MIYAMOTO: Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal*, 87, 449-456 (2016) 査読有
- ③ SUDUN, WULIJIDELIGEN, Kensuke ARAKAWA, Mari MIYAMOTO and Taku MIYAMOTO: Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, an alcoholic fermented milk. *Animal Science Journal*, 84, 66-74 (2013) 査読有
- ④ 烏力吉徳力根・池田裕美・濱田千恵・吉村諭史・小野夏彦・Thognemekh BOLORMAA・蘇 敦・宮本 拓：

モンゴル地域の馬乳酒における乳酸菌分布について. *Milk Science*, 62, 77-83 (2013) 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 宮本 拓：特別講演「世界の発酵乳・発酵食品とその発酵微生物を探して」，第12回日本栄養改善学会中国支部学術総会，平成28年6月26日，岡山県立大学（岡山県総社市）
- ② Taku MIYAMOTO, SUDUN, WULIJIDELIGEN, Sedhuu BURENJARGAL, Kensuke ARAKAWA, Takayuki ASAHINA and Kazushi HARA : Microbial interaction between lactic acid bacteria and yeasts in airag, a Mongolian alcoholic fermented milk. IDF World Dairy Summit, P-ST063, October 28-November 1, Yokohama, Kanagawa, Japan (2013)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 拓(MIYAMOTO TAKU)  
 ぐらしき作陽大学・食文化学部・教授  
 研究者番号：00093708