

氏 名 烏力吉徳力根
授与した学位 博 士
専攻分野の名称 農 学
学位授与番号 博甲第4575号
学位授与の日付 平成24年 3月23日
学位授与の要件 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻
(学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目 馬乳酒の乳酸菌フローラとその抗微生物作用に関する研究
論文審査委員 教授 宮本拓 教授 近藤康博 教授 坂口英

学位論文内容の要旨

馬乳酒は地域特異性、民族特異性の高い飲み物で、酸味を伴った白色のアルコールを含有する乳飲料としてモンゴル民族に愛飲されている。馬乳酒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、含まれる乳酸菌の抗微生物作用を明らかにすることは馬乳酒の製造技術进行研究する上で重要である。本研究ではモンゴル国、中国内モンゴル自治区から採取した馬乳酒に由来する乳酸菌の分離と同定を行い、地域や試料による乳酸菌フローラの特徴を調べた。また分離乳酸菌の生理機能、特に乳酸菌の抗微生物作用について検討した。

モンゴル国と中国内モンゴル自治区からの試料 13 種類からそれぞれ乳酸球菌 128 株と乳酸桿菌 126 株を分離した。そのうちモンゴル国の試料には乳酸球菌 5 種と乳酸桿菌 6 種が含まれ、中国内モンゴル自治区の試料には乳酸球菌 5 種と乳酸桿菌 2 種が含まれていた。これらのモンゴル地域の試料において共通性を示す優勢菌種として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* などの中温性乳酸菌が主に分離された。またモンゴル国試料からは *Streptococcus thermophilus* や *Lactobacillus acidophilus* などの高温性ホモ型乳酸菌が検出された。

これらの分離した乳酸菌を用い、指標菌 *Penicillium crysogenum* JCM2056 に対する乳酸菌の抗カビ活性を調べたところ、乳酸球菌 7 株と乳酸桿菌 9 株の合計 16 株において、強い抗カビ活性が見られた。このうち、抗カビスペクトルの広がった *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 368 は培養 12 時間で抗カビ活性が検出され、48-60 時間で最高値 (900 AU/mL) に達し、60 時間以降は低下して、72 時間まで活性を保持し、培地の pH が 6.2 から 4.2 まで低下した。

一方、*Listeria monocytogenes* VTU206 を指標菌として、馬乳酒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、抗菌活性が最も強かった 406 株をスクリーニングした。406 株は 16SrDNA の塩基配列の相同性により *Leuconostoc 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℃24 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、本研究では馬乳酒の主要な構成菌種である *Leuconostoc mesenteroides* の抗微生物作用をはじめて明らかにした。これらの知見はモンゴル地域の伝統的アルコール発酵乳である馬乳酒の製造技術を改良する上で有意義な情報となる。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。

論文審査結果の要旨

馬乳酒は地域特異性、民族特異性の高い飲み物で、酸味を伴った白色のアルコールを含有する乳飲料としてモンゴル民族に愛飲されている。馬乳酒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、含まれる乳酸菌の抗微生物作用を明らかにすることは馬乳酒の製造技術を研究する上で重要である。本研究ではモンゴル国、中国内モンゴル自治区から採取した馬乳酒に由来する乳酸菌の分離と同定を行い、地域や試料による乳酸菌フローラの特徴を調べた。また分離乳酸菌の生理機能、特に乳酸菌の抗微生物作用について検討した。

モンゴル国と中国内モンゴル自治区からの試料 13 種類からそれぞれ乳酸球菌 128 株と乳酸桿菌 126 株を分離した。そのうちモンゴル国の試料には乳酸球菌 5 種と乳酸桿菌 6 種が含まれ、中国内モンゴル自治区の試料には乳酸球菌 5 種と乳酸桿菌 2 種が含まれていた。これらのモンゴル地域の試料において共通性を示す優勢菌種として *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* などの中温性乳酸菌が主に分離された。またモンゴル国試料からは *Streptococcus thermophilus* や *Lactobacillus acidophilus* などの高温性ホモ型乳酸菌が検出された。

これらの分離した乳酸菌を用い、指標菌 *Penicillium crysogenum* JCM2056 に対する乳酸菌の抗カビ活性を調べたところ、乳酸球菌 7 株と乳酸桿菌 9 株の合計 16 株において、強い抗カビ活性が見られた。このうち、抗カビスペクトルの広がった *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 368 は培養 12 時間で抗カビ活性が検出され、48-60 時間で最高値 (900 AU/mL) に達し、60 時間以降は低下して、72 時間まで活性を保持し、培地の pH が 6.2 から 4.2 まで低下した。一方、*Listeria monocytogenes* VTU206 を指標菌として、馬乳酒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、抗菌活性が最も強かった 406 株をスクリーニングした。406 株は 16SrDNA の塩基配列の相同性により *Leuconostoc 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℃24 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、本研究では馬乳酒の主要な構成菌種である *Leuconostoc mesenteroides* の抗微生物作用をはじめて明らかにした。これらの知見はモンゴル地域の伝統的アルコール発酵乳である馬乳酒の製造技術を改良する上で有意義な情報を与えるものであり、博士（農学）の学位に値するものと判定する。