

氏名	蘇 敦
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第4647号
学位授与の日付	平成24年 9月27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	Study on the microbial interaction between lactic acid bacteria and yeasts isolated from airag, an alcoholic fermented milk (アルコール発酵乳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に関する研究)
論文審査委員	教授 宮本 拓 教授 坂口 英 教授 近藤 康博

学位論文内容の要旨

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。本研究では、中国内モンゴル自治区の遊牧民の家庭から採取したアイラグを供試し、分離した乳酸菌と酵母における微生物間相互作用を検討した。また、共生作用のある乳酸菌と酵母では、それらの生育促進効果を調べると共に、発酵乳用スターターの開発に向けた基礎研究を行った。

中国内モンゴル自治区の遊牧民の家庭で伝統的に製造された5種類のアイラグ試料から108株の酵母を分離し、7菌種に同定した。そのうち、乳糖発酵性酵母の *Candida kefir* が最も優勢に分離されており、*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* も分離された。一方、乳糖非発酵性酵母では *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces servazzii* などが含まれていた。

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 kefir* 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 kefir* 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(コスモシール 5C18-AR-300)によって生育促進物質の精製を試みた結果、単独培養に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、画分 9 を含む TG 液体培地での生育促進効果が最も高かった。

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て明らかにした。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。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。

論文審査結果の要旨

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。本研究では、中国内モンゴル自治区の遊牧民の家庭から採取したアイラグを供試し、分離した乳酸菌と酵母における微生物間相互作用を検討した。また、共生作用のある乳酸菌と酵母では、それらの生育促進効果を調べると共に、発酵乳用スターターの開発に向けた基礎研究を行った。

中国内モンゴル自治区の遊牧民の家庭で伝統的に製造された5種類のアイラグ試料から108株の酵母を分離し、7菌種に同定した。そのうち、乳糖発酵性酵母の *Candida kefir* が最も優勢に分離されており、*Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* も分離された。一方、乳糖非発酵性酵母では *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces servazzii* などが含まれていた。

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 kefir* 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 kefir* 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(コスモシール 5C18-AR-300)によって生育促進物質の精製を試みた結果、単独培養に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、画分 9 を含む TG 液体培地での生育促進効果が最も高かった。

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。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ものであり、博士(学術)の学位に値するものと判定する。