

## 【目的】

馬乳酒とはウマの生乳を用いて未加熱でつくられた、アルコール分約 1.5—2.5%程度ドロク状の乳酒である。馬乳酒中には多くの細菌、酵母 (真菌類) が存在しており、多様な微生物叢を形成していることが分かっている。乳酸菌においては球菌と桿菌が共に存在しており、酵母とは代謝物を介して複雑な相互作用を及ぼしていることが分かっている。これまで従来の分離培養法に続き、次世代シーケンサーを組み合わせた菌叢解析も行われてきたが、微生物叢の全容は未だに解明されていない。近年馬乳酒はモンゴル国内で流通の動きを見せており、一定した品質の維持や安定した発酵が必要とされている。そこで本研究では蛍光標識プライマーを用いて増幅した PCR 産物をシーケンサーで解析し、1塩基以上のフラグメントサイズ差から微生物種の判別を行う手法 (ARISA) を用い馬乳酒の微生物叢と風味との関係性を解析した。

## 【方法】

モンゴル国、キルギス、ヤクート共和国にて採取した $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存してきた馬乳酒 23 サンプルを用いた。単離菌株は馬乳酒より単離された研究室の保存菌株 32 種類を用いた。(1) ARISA による解析は、PPSmagLEAD12gC を用いて核酸抽出を行った。Bac-2 及び Fun-1 プライマーで PCR 増幅を行い、電気泳動でバンドサイズ確認後フラグメント解析を依頼した。(2) 香気成分分析は、馬乳酒サンプルに内部標準としてシクロヘキサノール ( $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えて封入し攪拌し、予備加熱後に SPME で揮発成分を 10 分間抽出した。GCMS-QP2010 (島津製作所、京都) を用いて GC/MS 分析を行った。カラムは DB-WAX ( $30.0\text{m}\times 0.25\text{mm I, D}$ , 膜厚  $0.25\ \mu\text{m}$ , J&W Scientific) を用いた。検出された各成分はマススペクトルデータベース (NIST) との比較により同定した。

## 【結果】

馬乳酒の電気泳動の結果を Fig. 1 に示した。両プライマーにおいて明瞭なバンドが見られた。ARISA 解析により得られた結果を Fig. 2 に示した。図中の青のピークは細菌、緑のピークは酵母を表しており、縦軸は蛍光強度 (AU)、横軸はフラグメントサイズ (bp) を表している。細菌と酵母両方のフラグメントサイズのデータが得られ、種類や量は非常に多様であった。Fig. 2 に示した 6 種類の主要な微生物が馬乳酒に含まれていた割合を Table. 1 に示した。地域ごとに ARISA のピークパターンを比較すると地域差が見られた。同じ馬乳酒サンプルの ARISA 解析結果と香気成分の分析結果を Fig. 3 に示した。全てにエタノール、乳酸エチル、イソアミルアルコール及びカプリル酸エチルが見られた。そのうち、イソアミルアルコールとカプリル酸エチルは No. 23 (コンクール優勝宅) のサンプルが他と比較して少なかった。No. 23 には「ボンド臭」と呼ばれる酢酸エチルがほとんど見られず、「青臭さ」と呼ばれるヘキサノールが他よりも多かった。馬乳酒には酢酸を産生するヘテロ乳酸菌の *Lactobacillus brevis* の存在が確認されているが、馬乳酒の風味がより良くなるためには、同じく馬乳酒づくりに関与するホモ乳酸菌の *Lactobacillus helveticus* が優勢菌となることが重要であると考えられた。馬乳酒より単離された細菌及び酵母計 32 種類を ARISA 解析にかけた結果、細菌が 8 種類、酵母が 5 種類のパターンに分けられた。701.78 $\pm$ 0.1%のエリアにピークが現れた 3 種類の酵母をまとめた。約 80%の馬乳酒に存在していた主要な酵母は 701.78 $\pm$ 0.1%に表れる乳糖発酵性酵母である *Kluyveromyces marxianus* であるということが分かった。

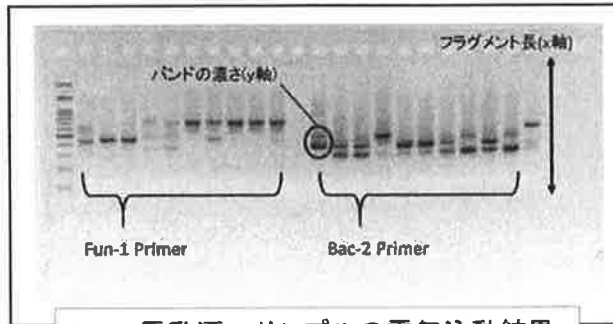


Fig.1 馬乳酒10サンプルの電気泳動結果

Table.1 ARISA解析により得られた主要な細菌及び酵母が馬乳酒に含まれていた割合

バンドサイズ	細菌			酵母	
	305.99±0.1%	387.46±0.1%	559.03±0.1%	508.41±0.1%	701.78±0.1%
1000≦	13	15	5	0	12
	56.52%	65.22%	21.74%	26.09%	52.17%
50≦	18	21	10	0	18
	76.26%	91.30%	43.48%	26.09%	78.26%

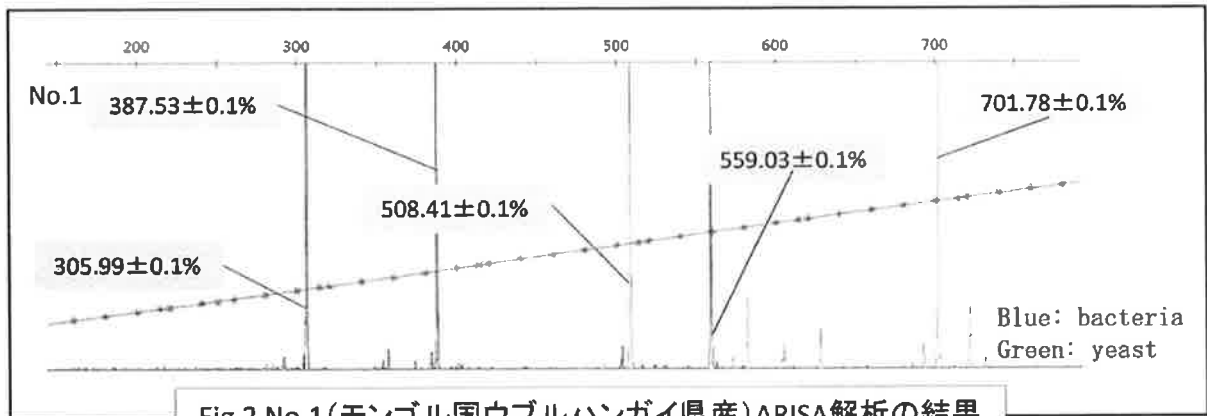


Fig.2 No.1(モンゴル国ウブスハンガイ県産)ARISA解析の結果

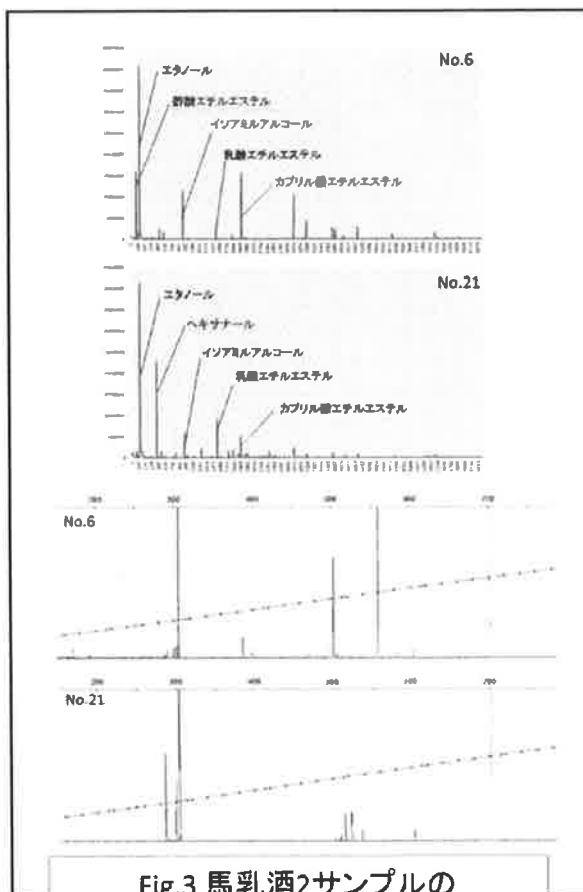


Fig.3 馬乳酒2サンプルの香り成分の分析結果比較(上段)とARISA解析結果の比較(下段)

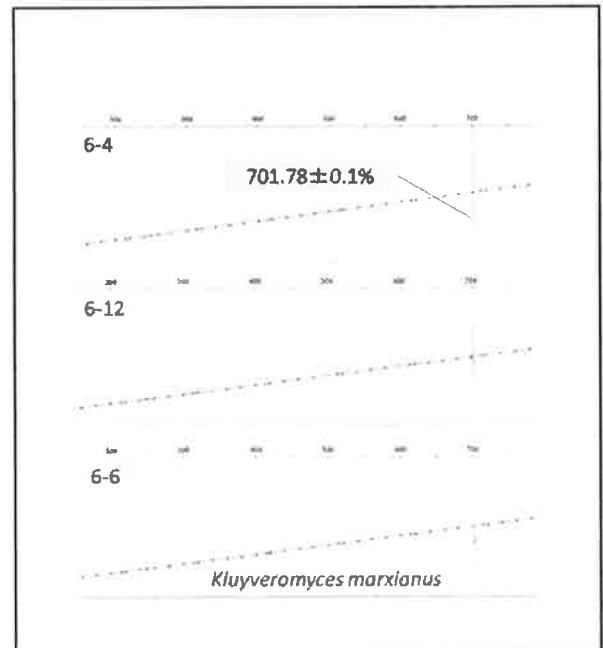


Fig.4 馬乳酒から分離した研究室保存菌株のARISAの特異バンドサイズ