

2017 年度

修士論文

馬乳酒の風味と微生物叢の関係

学籍番号 21634002 高橋 宗一郎

指導教員 臨床栄養学 石井 智美 教授

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

目次

1. 緒言	1
2. 材料と方法	7
(1) 試料	7
1) 馬乳酒のサンプル	7
2) 単離菌株	7
(2) ARISA による解析	7
1) 核酸抽出	7
2) PCR	8
3) 電気泳動	8
4) フラグメント解析	8
(3) 香気成分分析	8
1) 試料調整	8
2) 予備加熱	9
3) SPME	9
4) GC/MS	9
5) 同定	9
3. 結果	10
(1) DNA 抽出結果	10
(2) PCR 結果	10

(3) ARISA 解析結果	10
(4) 微生物叢の地域差	11
1) モゴト郡産馬乳酒の微生物叢	12
2) アルバイヘール産馬乳酒の微生物叢	12
3) キルギス産馬乳酒の微生物叢	13
4) モンゴル国際馬乳酒コンクール優勝宅馬乳酒の微生物叢	14
(5) 香気成分の分析結果と微生物叢の比較	14
(6) 単離菌の解析結果	15
4. 考察	17
(1) 微生物叢の地域差	17
1) モゴト郡及びアルバイヘール産馬乳酒の微生物叢の比較	17
2) キルギス産馬乳酒の微生物叢	18
3) モンゴル国際馬乳酒コンクール優勝宅馬乳酒の微生物叢	19
(2) 香気成分と微生物叢	20
(3) 微生物種の特定	24
5. 要約	29
Summary	30
謝辞	32
参考文献	33
図表	

1. 緒言

馬乳酒とはウマの生乳を用いて未加熱で作られたドブロク状の乳酒である。馬乳酒は内陸アジアの各地で飲用されてきたため、各地において名称が異なる。モンゴルでは Airag、内蒙古では Chigo、キルギスやカザフスタン、ヤクート、ロシアにおいては Kumiss と呼ばれている[1]。本研究においては統一して馬乳酒と記す。ドブロク状の酒の一種であり馬乳酒が飲まれてきた歴史は長く[2]、紀元前 4500 年頃から飲まれてきたとされている[3]。

遊牧民は馬乳酒を「白い食べもの」と呼び、飲料でありながら栄養源という意味においても、遊牧民の認識においても食品としての位置にある。これに対して肉は「赤い食べもの」と呼ばれ、これら白い食べものと赤い食べものはモンゴルにおける二大食品であると言える[4]。モンゴル遊牧民の食生活は冬季と夏季で大きく異なっており、冬季は厳しい寒さを凌ぐために肉中心の食生活となるが、夏季は乳製品が中心となる。彼らは夏季に乳製品を摂取することについて「冬の肉食で疲れて赤くなった胃を、夏に乳製品を食べて白くする」と表現しており[5]、そこには長い歴史の中で培われてきた遊牧民の生きる知識が垣間見える。

ウマの生乳はたんぱく質が少なく、乳糖量が多いため、ヒトの乳に近い[5][6]。そのためチーズという固形状の食品に加工する

ことは出来ない。アルコール発酵させることで保存性を高めているが、アルコール分はおよそ 1.5—2.5%程度であり、長期保存を目的としてはいない。アルコール分が低いということもあり、子どもにも飲まれている。夏季の摂取量は非常に多く、10L 程度飲むのは一般的で、男性では 1 日に 30L 飲むケースもある。微発泡であることがこうした多量の飲用を可能にしている一つの要因であるとも言われている[5]。一般的にモンゴルの人びとは乳糖不耐症であると言われていながら、彼らがこうして多量に飲用しても問題がないのは、発酵によって乳糖が分解されているからである[7]。微生物が乳糖を消費して発酵することで少なくとも 30—40%の乳糖が分解され、最大で 48%の乳糖が分解されることが分かっている。発酵の利点はこういったところにもあるのである。ウマという家畜は遊牧民にとって特別な動物である。ヒツジやヤギの搾乳が減る傾向にある中、泌乳量がそれらに比べて少なく、搾乳の手間が掛かるにも関わらず、依然としてウマの搾乳は行われ続けている[8]。馬乳酒はそれだけ遊牧民に好まれ、生活に欠かせない食品なのである。

馬乳酒の栄養学的な側面も研究されてきた。遊牧民の間では「結核に効く」「胃腸、肝臓に良い」「血圧が低い人に良い」「肌が白くなる」といった健康効果が伝わっている[5]。こうした伝承の

裏付けをとる研究の中で、馬乳酒は遊牧民のビタミンC供給源となっていること、馬乳酒飲用量と血清ビタミンC濃度の上昇が相関関係にあること、そして馬乳酒摂取による血清トリグリセリド及び総コレステロールの減少効果が示唆されている[20]。プロバイオティクスという概念[9]が提唱されて久しいが、馬乳酒はまさに遊牧民の間で長年飲用されてきたプロバイオティクス食品なのである。

その微生物学的な特徴も研究の対象となっており、これまでに多くの研究者が馬乳酒から有用な微生物を単離しようとしてきた。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。細菌においても球菌と桿菌が同じ馬乳酒中に存在することが知られている[10]。こうした微生物学的に多様である大きな理由の一つが、馬乳酒の製造過程に加熱がないためである。馬乳酒は、搾ったウマの乳を冷やした後、容器に入れて攪拌して作られる。これにより多様な微生物が増殖し、複雑な微生物叢を形成しているのである。こうした微生物叢の中で、細菌と酵母は互いに共生関係にあるものがあることも分かっている[6]。馬乳酒中の微生物は発育温度域が広く、低温での発育も可能な菌株が多い[6]。こうした性質は、低温や高標高といった厳しい環境で長い時間をかけて淘汰が

繰り返される中、微生物が獲得してきた性質であると言える。馬乳酒中には種々の乳酸菌が含まれているが、乳酸菌とは慣用的名称であり、分類学上の呼び名ではない[11]ことを、ここに記しておく。

一般的に発酵食品を作る際にはスターターとなる微生物を添加する。それは馬乳酒においても同様である。現在モンゴルにおいて一般的なスターターは、その年、別の家庭で先に作られた馬乳酒を自家ウマ乳に加える方法である[12]。その際にはスターターとなる馬乳酒 10L を同量のウマ乳に加える。その他、前年の馬乳酒を冷暗所で保存しておいたものを加える、前年の馬乳酒に穀物粒を浸して乾燥保存したものを加える、ツリガネ科の野草ハルガイを生のまま加えるといった方法が知られている。さらにウマ以外の家畜の乳や加工途中のホエー等が継ぎ足しされ作られる自家製の発酵乳オンダーもスターターとして用いられていることが分かっている[13]。これは馬乳酒以外の発酵乳を作る際にも用いられている。この他、馬乳酒の容器にウマ乳を加えるだけで馬乳酒になると言う遊牧民も多い[12]。発酵に用いられる容器は、現在は扱いやすいプラスチックの容器が主流になってきているが、かつては伝統的なフフルと呼ばれる容器が一般的だった。これはウシの皮を袋状に縫い合わせた容器で 7－8 年の使用が可能

であった[12]。これらのように、スターターそのもの或いは容器、室内に多様な微生物が存在しており、発酵条件や環境、特有の製造の工程が、複雑かつ多様な微生物叢を形成してきた。

特異的な菌を探索する研究を含め、これまで数々の手法で馬乳酒中の微生物の研究が行われてきた。近年では次世代シーケンサーを取り入れた解析が行われているものの[14][24][28][40][41]、微生物叢の全容は未だ解明されていない。

これまで遊牧民の飲み物であり、流通されることが少なかった馬乳酒が近年モンゴル国では流通の動きを見せている[15]。商品として流通させるには馬乳酒の質や美味しさを客観的に判断できる指標が必要となる。馬乳酒の基本的な成分は大きな差がないにも関わらず、遊牧民は美味しい馬乳酒とそうではない馬乳酒を明確に区別してきた[5]。これにはウマの乳成分、微量成分と微生物叢が関与していると考えられ、本研究では ARISA という微生物叢を解析する手法に着目した。

ARISA(Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis:自動 rRNA 遺伝子間多型解析)[16]は rRNA の多型領域をケイ光標識プライマーを用いて PCR 増幅した後、シーケンサーによって解析して、1塩基長以上のフラグメント長の差から微生物種の判別を行う手法である。これまで ARISA は食品への応用がほとんどされず、食

中毒や微生物種の鑑別という目的に用いられてきた [17][18][19]。この手法は簡便かつ安価で微生物叢を解析することが出来る手法として、近年注目されている。同じく DNA ベースでの解析手法として次世代シーケンサーによるメタゲノム解析があるが、これは一検体あたりのコストが高く、情報量も膨大となる。ARISA ではメジャーピークが一目で分かり、特定のパターンを識別することが容易である他、次世代シーケンサーでは解析できない酵母（真菌類）の解析も行うことが出来る。しかし ARISA で微生物種を特定するためには他の手法と組み合わせた運用が必要となる。この手法は馬乳酒という複雑な微生物叢を持つ食品を解析する上で非常に有用であると考えられた。ARISA による解析の結果、微生物叢と風味、おいしさとの間に共通したパターンが見られれば、微生物叢が馬乳酒の味を評価する上での一つの指標になる可能性があるのではないかと考えた。本研究では馬乳酒における微生物叢及び風味との関係性を解析し、ARISA による解析結果が馬乳酒を評価する上での指標となり得るかどうかを検討した。

2. 材料と方法

(1) 試料

1) 馬乳酒のサンプル

モンゴル国、キルギス及びヤクート共和国にて、1998 年から 2012 年の間に採取された馬乳酒 23 サンプルを用いた。これらは冷凍もしくは冷蔵状態で保管後、研究室にて-80℃の冷凍状態で保存してきた。サンプリングした地域の位置関係を Fig. 1 に示した。

2) 単離菌株

馬乳酒より単離された研究室の保存菌株 32 種類をサンプルとして用いた。

(2) ARISA による解析

1) 核酸抽出

サンプルをガラスビーズと共にチューブに入れ、破砕機で 2000rpm-3 分間破砕した後、遠心分離(15000rpm-5 分)を行った。タンパク質を除去するため、沸騰状態を保った熱湯中に 10 分間保持する Bio1 処理を行った後、核酸抽出液を 200 μ L 得た。PSS magLEAD 12gC(全自動核酸抽出装置)を用い、シリカゲルへの吸着を利用した磁気ビーズによる核酸抽出を行った。

2) PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)

抽出した DNA に細菌の DNA を増幅させる Bac-2 プライマーセット及び、酵母の DNA を増幅させる Fun-1 プライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。

3) 電気泳動

アガロースゲルを用い、PCR 増幅程度及びバンドサイズ確認のため、電気泳動を行った。時間はおよそ 20—30 分だった。

4) フラグメント解析

ファスマック社へ解析を依頼し、結果を解析ソフト Peak Scanner で解析した。

(3) 香気成分分析

1) 試料調整

サンプル 1ml をスクリーキャップ付きバイアルに入れ、内部標準として 50 μ l のシクロヘキサノール (100 μ g/ml) を加えて封入し、撹拌した。

2) 予備加熱

ブロックヒーターで 60℃を 10 分間維持し、予備加熱を行った。

3) SPME (固相マイクロ抽出)

バイアルを 60℃に保ち、固相マイクロ抽出ファイバー (50/30 μ m Divinylbenzene/Carboxen[™]/Polydimethylsiloxane) で、揮発性成分を 10 分間抽出した。

4) GC/MS

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 (30.0m×0.25mm I, D, 膜厚 0.25 μ m, J&W Scientific) を用いた。注入口温度は 200℃, カラム温度は 50℃を 2 分間保持し, その後 200℃まで 3℃/min で昇温、200℃を 5 分間保持して分析を行った。

5) 同定

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。

3. 結果

(1) DNA 抽出結果

馬乳酒中の微生物の DNA 抽出はこれまでに実施されたことがなかったため、抽出工程の検討を進め、抽出工程に Boil 処理を加えることで安定して十分な量の DNA を抽出することが可能になった。馬乳酒は牛乳に比べて脂肪分が少ないため、クロロホルム処理を行わなくても抽出には支障がないことが分かった。

(2) PCR 結果

馬乳酒サンプルの PCR 結果を Fig.2 に示した。Fun1 及び Bac2 両プライマーにおいて明瞭なバンドが見られた。フラグメント長は全てのサンプルにおいて、おおむね 900 程度であった。

(3) ARISA の解析結果

ARISA 解析により得られた結果を Fig.3 上段に示した。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、縦軸はピーク高（蛍光強度：AU）、横軸はフラグメントサイズ（bp）つまり PCR 産物のサイズを表している。異なる微生物は異なるフラグメントサイズに表れ、ピークが高いほどシグナル強度が強い、つまりサンプル中の DNA が多かったことを示している。全てのサンプルに

において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。細菌の種類は酵母の種類よりも多かった。Fig. 3 下段では 300-700bp の部分を 10 倍に拡大して表しているが、大きなピーク以外にも小さなピークが数多く存在していることがよく分かった。これは馬乳酒中の微生物叢の複雑さを表しており、先行研究と一致していると言える [21]。本研究ではピーク高が 50 以上のピークを一つの微生物種としてカウントしている。また、フラグメントサイズの差が 0.1%の範囲にあるものを同種の微生物であると判断した [19][39]。

(4) 微生物叢の地域差

馬乳酒サンプルの解析を行った結果、多くのサンプル中に表れる主要な細菌及び酵母がそれぞれ 4 種類、2 種類存在していることが分かった。Fig. 3 にはそれら 6 種類全てが見られるものを示した。Table. 1 にそれら 6 種類のピークと存在する割合をまとめた。上段には 1000 以上の大きい値を示したメジャーピークのみをカウントした結果、下段には 50 以上の全てのピークを合わせた結果を示した。305.99±0.1%の細菌と 701.78±0.1%の酵母で約 8 割、387.46±0.1%の細菌で約 9 割という高い割合でサンプルに含まれていた。DNA ベースで見た際にも、産地や採取年度の異な

るサンプルから共通して検出される微生物が存在していることが分かった。

先行研究から、馬乳酒に含まれている微生物は遊牧民の定住地域や家庭（ゲル：移動式天幕住居）の影響を受けることが分かっているため[5][22]、得られた結果をそれぞれの地域ごとに分類して比較した。

1) モゴト郡産馬乳酒の微生物叢

モンゴル国モゴト郡産馬乳酒全 6 サンプルの解析結果を Fig. 4 に示した。この結果から、存在しているピークパターンにおいて特徴的な共通点は見られなかった。しかし、主要な微生物として挙げた $508.41 \pm 0.1\%$ の酵母はモゴト郡の馬乳酒には見られなかった。それらを Table. 2 に示した。

2) アルバイヘール産馬乳酒の微生物叢

モンゴル国アルバイヘール産馬乳酒の解析結果を Fig. 5 に示した。この地域の解析結果には、特徴的な共通点が見られた。アルバイヘール産の 6 サンプル全てに $387.46 \pm 0.1\%$ の細菌及び $701.78 \pm 0.1\%$ の酵母が確認された。さらにモゴト郡のサンプルには一切見られなかった $508.41 \pm 0.1\%$ の酵母が 4 サンプル（67%）

で見られた。 $305.99 \pm 0.1\%$ の細菌及び $559.03 \pm 0.1\%$ の細菌についても 83%のサンプルに含まれており、馬乳酒の発酵に大きく関わっていると思われる微生物が多く含まれていることが分かった。これらの結果を Table. 3 に示した。

3) キルギス産馬乳酒の微生物叢

次に Fig. 6 上段にキルギス産馬乳酒 2 種類の比較をした結果を示した。これらはそれぞれつくられた家庭及び標高が異なっており、No. 15 は標高 2800m、No. 16 は標高 2300m の場所で作られたサンプルである。両者のピークパターンは極めて類似しており、メジャーピークは全て一致していた。Fig. 6 下段では一部を 20 倍に拡大した図を示したが、細かいピークも多くが一致していた。標高が低い場所で作られた馬乳酒は、標高が高い場所で作られた馬乳酒に比べてシグナル強度が強かった。さらに他の馬乳酒には全く見られなかった $287.34 \pm 0.1\%$ の細菌が、キルギス産の馬乳酒 2 種類にのみ見られた。また、 $450.94 \pm 0.1\%$ の酵母はキルギス産以外の馬乳酒には 1 種類にのみ見られるマイナーな酵母であるが、それが両方のサンプルから検出された。これらのように他の産地の馬乳酒とは異なったピークパターンが見られた。キルギス産馬乳酒中の主要な微生物を Table. 4 にまとめた。

4) モンゴル国際馬乳酒コンクール優勝宅馬乳酒の微生物叢

Fig. 7 に示したのは 2012 年にモンゴル国際馬乳酒コンクールで優勝した家庭でつくられた馬乳酒 2 種の微生物叢を比較したものである。ピーク高が高い細菌が 300 付近に密集して表れており、酵母については他の馬乳酒にも共通して見られた $701.78 \pm 0.1\%$ の酵母が非常に強いシグナル強度で表れており、すっきりとしたピークパターンであることが分かる。Table. 5 にはメジャーピークとそのピーク高を馬乳酒ごとに示した。300 付近の細菌のピークは、実際には $303.70 \pm 0.1\%$ 、 $304.73 \pm 0.1\%$ 及び $305.35 \pm 0.1\%$ の 3 ピークに分かれており、その内 $305.35 \pm 0.1\%$ はコンクールで優勝した No. 23 (2012 年度) の馬乳酒にのみ見られた。

(5) 香気成分の分析結果と微生物叢の比較

これまでの本研究室で行われてきた香気成分の分析結果に加え、新たに 2 種類の馬乳酒の香気成分を分析し、微生物叢との比較を行った。Fig. 8 には馬乳酒コンクールで優勝した No. 23 と No. 6 (アルバイヘル産) のサンプルの香気成分の測定結果を示した。No. 6 の結果はこれまでに測定されていた No. 2 (アルバイヘル産) 及び No. 4 (モゴト産) と類似した結果となった。これ

らをまとめた結果を Table. 6 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 のサンプルが他と比較して少なかった。最も大きな違いは、酢酸エチルとヘキサナールの量の違いで、No. 23 以外のサンプルには強い強度で酢酸エチルのピークが出ていたのに対し、No. 23 ではそのピークが非常に弱く、極小さなピークは存在しているものの図中で確認することは出来なかった。また、酢酸エチルとは対照的にヘキサナールは No. 23 にのみ強いピークとして検出された。その他に No. 2 及び No. 4 においては分析の後半にデカン酸エチル、オクタン酸、デカン酸という順で目立ったピークを示していた。

Fig. 9 に No. 6 と No. 23 の馬乳酒の ARISA 解析結果の比較を示した。 $305.35 \pm 0.1\%$ の細菌及び $701.78 \pm 0.1\%$ の酵母が共通して見られた。No. 6 には他にも大きいピークを示す細菌が多かったのに対し、No. 23 では No. 6 よりも細菌のメジャーピークが少なかった。

(6) 単離菌の解析結果

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。32 種類の微生物の中には、遺伝子的に同じであるものが複数含まれていた。

この解析の結果、微生物種が特定されたピークがいくつかある。Fig. 10 には馬乳酒から分離した細菌の ARISA 特異フラグメントサイズを示した。馬乳酒には *Lactobacillus plantarum* 及び *Lactobacillus casei* が存在していることが糖の発酵性試験等によって確認されている。Fig. 10 で示したピークにそれぞれの菌が現れることが分かったが、同じピークは馬乳酒中に存在せず、ARISA による解析結果としては、これらの細菌が馬乳酒中には存在していなかった。また、 $305.99 \pm 0.1\%$ の細菌に関しては、現在同定作業を進めている。

Fig. 11 に $701.78 \pm 0.1\%$ のエリアにピークが現れた 3 種類の酵母をまとめた。このピークに出てくるのは乳糖発酵性酵母である *Kluyveromyces marxianus*[37]であるということが分かった。

4. 考察

(1) 微生物叢の地域差

産地や採取年度の異なるサンプルから同じピークが共通して検出されるということは、これらの微生物が馬乳酒の発酵に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。分離培養法では生菌しか分析することが出来ないが、ARISA を用いることで死菌であっても DNA が残存していれば解析することが可能である。今回のように、産地や採取年度が異なっていたとしても同様に解析出来たのは、ARISA の大きな利点を一つ示している。

1) モゴト郡及びアルバイヘール産馬乳酒の微生物叢の比較

環境によって異なる微生物叢であるが、その地域差は見る事が出来たと考えられる。モゴト郡はモンゴル国の中でも馬乳酒をよく作る地域として有名である [5]。そしてアルバイヘールはウブスハンガイ県の県庁所在地で馬乳酒の生産地として有名である。アルバイヘールは春季にモゴト郡よりも早く温かくなるため、馬乳酒づくりが早くに始まる。従来は家庭ごとに継ぎ足す方法や、別の発酵乳をスターターに用いる製法などが行われていたが、近年では先に作られた馬乳酒を購入し、それをそのままスターターとする製法が増えつつあることを先に緒言で述べた。アルバイヘ

ールはこうした製法でつくる家庭が、スターターとなる馬乳酒を買いに来る地域である。従ってアルバイヘル産の馬乳酒に顕著に含まれていた $508.41 \pm 0.1\%$ の酵母もモゴト郡産の馬乳酒から検出される可能性が高いと考えられたが、結果はそうではなかった。これは、スターターとして使用された馬乳酒中のこの酵母が増殖出来なかったことを示していると考えられた。スターター中に含まれていたとしても、馬乳酒の発酵を行う環境によって作用する微生物の種類は当然変化すると考えられ、モゴト郡産の馬乳酒においてはこの酵母が淘汰された可能性もあると考えられた。

2) キルギス産馬乳酒の微生物叢

標高が 500m 異なるにも関わらず、他の地域以上に、非常に酷似した微生物叢のパターンが確認された。他のサンプルをさらに解析していくことで、微生物叢が決定される環境的な条件を絞っていくことが出来るかもしれないと考えられた。

高標高や気温の変化が激しいことは微生物の発育にも影響があると考えられる。馬乳酒製造の際には作り手が温度を一定に保つために、地面に掘った穴に馬乳酒の発酵容器の一部を埋めたり、風通しを良くしたりという工夫がなされているが[5]、それでも標高の違いによる気温や昼夜の温度差等の影響により、微生物の

発育状況には大きな差があると考えられる。環境や気候の違いによって微生物叢は当然大きく変化するはずであり、モンゴル国とキルギスの環境の違いはピークパターンにも表れていると言える。また、キルギスにおいては伝統的な発酵容器フフルを低温でスモークして殺菌する習慣があることが分かっている[24]。こうした、他にはない習慣が微生物叢に変化を与えている可能性も十分に考えられる。

3) 国際馬乳酒コンクール優勝宅馬乳酒の微生物叢

同じ家庭の馬乳酒サンプルにおいて、10年後も非常に似た微生物叢であったことは、大変興味深い結果であると考えられた。他の馬乳酒サンプルと比較して、シグナル強度が強い菌とそうでない菌がはっきりと表れており、このパターンが美味しい馬乳酒を作る微生物叢のパターンである可能性が考えられた。また、遊牧民は酸度があまり高くない馬乳酒を好む傾向にあるという報告があるため[29]、乳酸菌と乳酸の生成量との関連性についても引き続き検討する必要がある。

$305.35 \pm 0.1\%$ の細菌は、他の馬乳酒に多く見られた $305.99 \pm 0.1\%$ の細菌とは 0.1 の範囲にいないため、これらが同一の微生物であると明確に判断することは出来ない。しかし ARISA はそもそ

も変異の多い DNA の多型領域を PCR 増幅して解析する手法であり、これまでの研究でも同一種間においても、1bp 程度の違いがあることが確認されている[39]。従って本研究においても、それぞれのピークが $\pm 0.1\%$ の範囲にないからといって、それらが間違いなく別の種の微生物であるとは断言出来ない。今後研究を進めていく中で、これら 2 つのピークが同じ種の細菌である可能性も考えなければならない。また同時に、こうした非常に近い位置に連続してピークが出るということが、美味しい馬乳酒のパターンである可能性も考えなければならない。ピークが近いことは、それぞれの微生物が種内多型、同一種の異なる株である可能性を示唆している。つまり、異なる株がいくつか含まれた状態で発酵することが、美味しさに繋がっている可能性があると考ええる。

(2) 香気成分と微生物叢

香りは馬乳酒の美味しさにとって重要ファクターであると考えられている。イソアミルアルコールはバナナに含まれる成分としてよく知られており[34]、6 位の炭素がアセチル化することでバナナ様の香りを生む酢酸イソアミルとなる[46]。カプリル酸エチルはフルーツの甘さを感じさせる香りとして知られており、清酒のベースアロマとしても認知されている[35]。これらは両者と

も醸造酒に含まれており、所謂「嫌なにおい」に分類されるものではないが、香りは他の香気成分と混ざること、単体で感じる時とは異なった感じ方となる。美味しいと評価された馬乳酒において、これらの成分が少ない傾向にあったということは、一定以上のイソアミルアルコール及びカプリル酸エチルは馬乳酒に好ましくない芳香を与える可能性があると考えられる。清酒酵母つまり *Saccharomyces cerevisiae* と *Kluyveromyces* 属（どちらも馬乳酒中の存在が確認されている）を混合培養することで、イソアミルアルコールとカプリル酸エチルの生成量が増えるという研究報告がある[31]そのため、この二つの香りの生成には2種類の酵母の代謝が関係していると考えた。

酢酸エチルは「ボンド臭」とも呼ばれ、鼻にくる刺激臭となるため好まれず、利き酒や清酒の官能評価を行う専門家にとっては言わずと知れた香気成分である[33]。清酒においては他の香りとのバランスが取れていれば、清酒らしい香りを作る一つの要素であると認知されるが、ワインにおいては基本的に欠陥香、オフ・フレーバーとして扱われている[42]。いずれにせよ多量の酢酸エチルは人間が不快に思う香りであるということが分かる。今回の分析で、美味しいと評価された馬乳酒には酢酸エチルがごく微量しか含まれていなかったのに対し、他の馬乳酒からは一定量が検

出されたという結果が得られたことは非常に重要だと言える。他の酒類と同じく馬乳酒においても多量の酢酸エチルは好ましくない香りを与えると考えられ、遊牧民はより酢酸エチルが少ない方が美味しい馬乳酒であると考えている可能性が高いと考えた。

乳酸菌の中には代謝によって酢酸を生成するヘテロ乳酸菌と、生成しないホモ乳酸菌が存在している[30]。馬乳酒にはヘテロ乳酸菌の *Lactobacillus brevis* の存在が確認されている[10][27]。また、ホモ乳酸菌の *Lactobacillus helveticus* は DNA ベースの解析において特に確認されている[25][26]。これらは共に存在していることが考えられるが、馬乳酒の風味をより良くするためには、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ることが出来る。

こうした酢酸エチルに対して、No. 23 の馬乳酒にのみ見られたヘキサナールも美味しさの鍵を握る成分の 1 つだと考えられる。ヘキサナールは不飽和脂肪酸にリポキシゲナーゼが作用して過酸化された後、ヒドロペルオキシドリアーゼにより開裂して生成される[32]。大豆はリポキシゲナーゼ活性が非常に強いため、ヘキサナールは一般的に「大豆の青臭さの成分」として知られている。リポキシゲナーゼは植物体中にも含まれているが、微生物もこの酵素を持ち合わせており、その酵素活性は様々である[36]。

馬乳酒中の不飽和脂肪酸から微生物の酵素によってヘキサナールが生成されたと考えられるが、前述した2種の香りとは異なり、ヘキサナールは単体ではあまり好ましいにおいとは言えない。このヘキサナールも他の香りと混ざること、ヒトは異なる香りに感じる可能性は多いにある他、そもそも遊牧民にとって青臭さ、つまり「青草を切ったようなにおい」は不快なおいではない可能性も十分にあり得る。この草の香りがある程度含まれることで彼らにとってはむしろ心地よい香りとなるのではないだろうかと考えられた。

遊牧民は家庭において馬乳酒が失敗しそうになると、ハルガイと呼ばれる草を発酵中の馬乳酒に加える伝統的な手法が知られており、この植物からは *Lactobacillus Plantarum* が見つかった[6]。ハルガイを入れることで馬乳酒中の微生物叢に変化が起こることが考えられるが、今回の結果から *Lactobacillus Plantarum* によってヘキサナールが生成されることにより他の好ましくないにおいをマスキングすることで、馬乳酒が不味となることを防いでいるのではないかと考えた。今後、ハルガイから得られた *Lactobacillus Plantarum* とヘキサナールに着目して関係性を追求していく価値は十分にあると考えられる。また、オクタン酸、デカン酸といった脂肪酸は動物的なにおいを示すと言われ

ているが、こうした香気成分と微生物叢の関係もより掘り下げていく必要があると考えられる。

今回はシクロヘキサノールを内部標準として測定しているため、これらの成分値は全て相当量として表されている。香気成分には閾値が存在するため実際にこれらの成分をヒトがどれだけ感じる事が出来るかどうかは未知である。しかし、この結果は非常に興味深いものであり、香りと微生物叢の関連性をより追求していくことで、微生物叢の特性からおいしい馬乳酒を判断出来る可能性があることを示唆していると言える。

(3) 微生物種の特定

主要な細菌の内、 $305.99 \pm 0.1\%$ 以外はピークを特定することが出来なかった。これは、ARISA が DNA ベースの解析方法であるのに対し、微生物の単離方法が分離培養法であるということが大きく関係していると考えられる。この方法は培養する条件などにより選択圧がかかり、培養しやすい菌と培養しにくい菌は確実に存在する。この結果は、今後二つの手法を用いて馬乳酒を解析するにあたり大いに意味のある結果であると言える。つまり、これまで分離培養法や糖では分からなかった馬乳酒の微生物学的な側面が ARISA による解析で見えてきたと言えるのであ

る。

さらに、他の研究において 387.67 のピークに *Lactococcus lactis* が現れることが分かっている。これは、本研究で約 90% の馬乳酒に見られた $387.46 \pm 0.1\%$ の細菌と一致する。そのため馬乳酒中のこの細菌は *Lactococcus lactis* の可能性が非常に高いと考えられる。

次世代シーケンサーの一種であるパイロシーケンスを用いて馬乳酒の微生物叢を解析した研究においては *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Streptococcus thermophilus*, *Citricoccus* sp. といった細菌が検出されている[25]。培地培養後、今回特定できなかった菌種がこれらである可能性を踏まえて、さらに解析を続けていく必要がある。

前述したとおり、 $701.78 \pm 0.1\%$ の酵母は馬乳酒中におよそ 80% の割合で見られたメジャーな酵母である。様々な産地のサンプルであるにも関わらず、ほとんどの馬乳酒から検出されたということは、馬乳酒造りにおいて重要な役割を担っていると言える。実際に馬乳酒の発酵においては、初期段階で細菌の代謝が行われ、その後酵母によるアルコール発酵が行われると言われているが、馬乳中でアルコール発酵をするには乳糖を利用しなければなら

ない。これまでの研究からも *Kluyveromyces marxianus* が馬乳酒中から検出されており、それが馬乳酒中に存在することは分かっている。DNA ベースの他の研究においても *Kluyveromyces marxianus* は確認されている[25][26]。これらの先行研究と一致する結果が示されたことは、ARISA の有用性が示されたことであると考えられた。もう一つ主要な酵母として先に $508.41 \pm 0.1\%$ という酵母を前述したが、このピークに当たる酵母は見つからなかった。しかし、同じく ARISA を用いた研究において 503.82 のピークに *Candida parapsilosis* が、 $608.67 \pm 0.1\%$ のピークに *Candida zeylanoides* が出てくることが分かっている[47]。不明なピークがこれらの菌の間にあることから、 $508.41 \pm 0.1\%$ の酵母も *Candida* 属である可能性が高いと考えられる。実際に馬乳酒の発酵に *Candida kefir* が関与していることが分かっているため、このピークが *Candida kefir* である可能性は十分考えられる。また、馬乳酒中には *Saccharomyces cerevisiae* も存在していることが分かっている。この酵母はワイン等の他の酒類におけるアルコール発酵の主役として利用されている菌である。 $822.80 \pm 0.1\%$ 及び $823.84 \pm 0.1\%$ のピークで検出されることが分かっており[39]、本研究において解析した単離菌の中に $825.67 \pm 0.1\%$ というピークを示した菌がおり、現在同定作業の進行中であるが

Saccharomyces cerevisiae あるいはその株違いである可能性は高いと言える。これらが分かると、馬乳酒における主要な酵母を特定できたことになり、ARISA による馬乳酒解析の大きな一歩であると言え、今後更なる解析を行う上での貴重なプロファイルとなり得るのは間違いない。

本研究により、従来の分離培養法とは異なる結果が得られた部分は多い。それは解析方法が根本的に異なっているためであり、この結果はむしろ ARISA が十分に馬乳酒の微生物叢の解析に活用出来ると言えるものであると考えられる。この解析により、発酵に関わる主要な細菌及び酵母の一部が特定され、特定されなかったものもそのピークに来る可能性のある菌種を絞り込むことが出来た。さらに、馬乳酒の美味しさの鍵を握りうる香気成分とそれに関与する微生物の関係についても示唆され、ARISA の可能性が十分に証明された結果であると言える。ARISA の利点は微生物が表れるピークが分かること、そして一目でその微生物の有無や量、パターンが分かるという点である。さらにメジャーピークという捉え方が出来るため、重要な微生物を絞り込むことも可能である。今後は一つの馬乳酒サンプルを次世代シーケンサーでメタゲノム解析し、メジャーピークの微生物を特定することで、馬乳

酒の発酵に関わる微生物種をより特定することが出来ると考えられる。また、馬乳酒から単離された微生物を TOF/MS によって同定し、ARISA のピークと照らし合わせることでさらに詳細な馬乳酒の微生物叢のプロファイリングが可能になると考えられる。今後研究を続けていくことで、馬乳酒の風味、美味しさを微生物叢から簡便に判断することが出来るようになる可能性が十分にあると言える。

5. 要約

成分や微生物叢が時間経過と共に変化し続ける馬乳酒における微生物叢の解析及び、微生物叢と風味の関係性の解析に ARISA を応用する可能性について検討した。馬乳酒 23 サンプルから主要な細菌 4 種類と酵母 2 種類が検出され、その内およそ 80% の馬乳酒に含まれていた 1 つの酵母が *Kluyveromyces marxianus* であると分かった。細菌類の 1 種類が *Lactococcus lactis*、酵母の 1 種類が *Candida kefyr* である可能性が高いと考えられた。微生物叢の地域差も確認され、美味しいと評価される馬乳酒には特定のパターンがある可能性が示唆された。香気成分との関連性においては、美味しい馬乳酒の風味はヘキサナールと酢酸エチルの量に関係していることが示唆され、そこには *Lactobacillus Plantarum* が関係している可能性が考えられた。微生物叢の特定及び、メジャーピークを示す微生物種の絞り込みが出来、馬乳酒の微生物叢を解析する上で ARISA を導入することの利便性を証明することが出来た。今後メタゲノム解析や TOF/MS 等の手法を活用しながら、さらに詳細な微生物のプロファイリングを行うことで、馬乳酒の風味と微生物の関係を追求することが出来るだろう。

Summary

Kumiss is a traditional drink made by fermenting raw horse milk with lactic bacterium and yeast in about 3 months of summer. We investigated the possibility of application of ARISA to analysis of microbial flora and analysis of relationship between microbial flora and flavor in Kumiss that ingredients and microbial flora continue to change with the passage of time. Four major bacteria and two yeasts were detected from 23 samples, and one yeast that was contained in about 80% in these was found to be *Kluyveromyces marxianus*. Furthermore, it was considered that one kind of bacteria is likely to be *Lactococcus lactis* and one kind of yeast is *Candida kefir*. Regional differences in the microflora were also confirmed, suggesting the possibility that a specific pattern might be found in delicious kumiss. It was suggested that the flavor of delicious kumiss is related to the amount of hexanal and ethyl acetate in relation to fragrance ingredients and there was a possibility that *Lactobacillus Plantarum* might be involved. It was possible to identify microbial flora and to narrow down the microbial species showing major peaks and

proved the convenience of introducing ARISA in analyzing the microflora of kumiss. By utilizing techniques such as metagenomic analysis and TOF / MS, we will be able to pursue the relationship between flavor of microorganisms and microorganisms by profiling further microorganisms. By utilizing techniques such as metagenomic analysis and TOF / MS, it was thought that be able to pursued the relationship between flavor and microorganisms.

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導賜りました指導教員の臨床栄養管理学研究室石井智美教授に心より感謝申し上げます。

また、実験に際し多くの知識や示唆を頂いた応用微生物学研究室の山口昭弘教授、同研究室元大学院生の Tu Zhihao 様、食品加工研究センター食品開発部、発酵食品グループの田中彰様に感謝申し上げます。

私の研究を支えてくださった臨床栄養管理学研究室の皆様に、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 石井智美, 馬乳酒をめぐる記述に関する文献的研究, 民俗学研究, Vol. 62, No. 1, 33-43, 1997
- 2) 臼井麻未, 横山智, アジアの伝統的酒研究の展開, 地理空間 Vol. 6, No. 1, 1-18, 2013
- 3) 中村尚哉, 2017, National Geographic, Vol. 23, No. 2, 33-55, 日経ナショナル・ジオグラフィック社, 東京
- 4) 富田敬太, 2016, モンゴル牧畜社会をめぐるモノの生産・流通・消費, 29-60, 東北大学東北アジア研究センター, 仙台
- 5) 石井智美, モンゴル遊牧民の製造する乳製品と馬乳酒の性質および特性. Milk Science. Vol. 64, No. 1, 53-62, 2015
- 6) 石井智美, 内陸アジアの遊牧民の製造する乳酒に関する微生物学的研究, 酒をめぐる地域間比較研究 JCAS 連携研究成果報告, 103-122, 2003
- 7) 石井智美, 内陸アジアの乳酒に関する微生物学的知見と機能性, 日本調理科学会誌, Vol. 34, No. 1, 99-105, 2001
- 8) 石井智美, 内陸アジアの遊牧民の動物性食品と植物性食品の利用, 酪農学園大学紀要 自然科学編, Vol. 35, No. 2, 17-31, 2011
- 9) Fuller R, Probiotics in man and animals, Journal of

Applied Bacteriology, Vol.66, 365-78, 1989

- 10) 石井智美, 馬乳酒の飲用がモンゴル遊牧民の栄養に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌, Vol.55, No.5, 281-285, 2002
- 11) NPO 法人チーズプロフェッショナル協会, 2016, チーズを科学する, 29-35, 東京
- 12) 石井智美, 馬乳酒に関する微生物学的知見と機能性, 日本醸造協会誌. Vol. 97, No.3, 210-215, 2002
- 13) 石井智美, モンゴル遊牧民の夏の食に関する調査, 日本家政学会誌, Vol.50, No.8, 845-853, 1999
- 14) 宮本拓, モンゴルの伝統的アルコール発酵乳アイラグに関する微生物学的研究, 岡山大学農学部学術報告, Vol.104, 35-47, 2015
- 15) 尾崎孝宏, 馬乳酒をめぐる生産・流通・消費:南モンゴル、シリングル盟の事例および地域間比較より, 日本地理学会発表要旨集, 日本文化人類学会研究大会発表要旨集 2016(0), G08, 2016
- 16) Madeline M. Fisher and Eric W. Triplett: Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater

- Bacteria Communities. Appl. Environ Microbiology. Vol.65,
No.10, 4630-4636(1999)
- 17) 菅原諒太ら, 自動 rRNA 遺伝子間多型解析 (ARISA) による
キノコ種鑑別の検討とカキシメジによる食中毒疑い事例への
適用の試み, 食衛誌, Vo.57, No.2, 2016
- 18) 碓井里菜, MALDI-TOF/MS 及び ARISA による乳房炎に関わ
る微生物種の同定, 酪農学園大学卒業論文, 2014
- 19) Tu Zhihao, Interaction between Microbes and Plant
Source Functional Foods -Microbiome analysis with
functional evaluation of *Zizania latifolia*, and
enrichment of the taste of *Aronia melanocarpa* fermented
with *Aspergillus awamori*-, 酪農学園大学修士論文, 2016
- 20) 宮澤正顕ら, モンゴル遊牧民馬乳酒の脂質代謝に与える
影響, 日本醸造協会誌, Vol.98, No.5, 322-328, 2003
- 21) ISHII Satomi , HOSINO Buho , KOMIYAMA Hiroshi, UEHARA
Aritune , NURTAZIN Sabyr, Study on Production and
Properties of Kumiss of Herders in Mongolian Dry Steppe
(DESERT TECHNOLOGY 11 INTERNATIONAL CONFERENCE), Journal
of arid land studies, Vol.24, No.1, 195-197, 2014
- 22) 渡辺幸一, モンゴルの伝統的発酵乳 (アイラグおよびタ

- ラグ) 中の乳酸菌および酵母の多様性, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria. Vol.30, No.3, 153-161, 2011
- 23) 石井智美, モンゴル遊牧民の馬乳酒製造方法と性質, アフロユーラシア内陸乾燥地文明叢書 7, 多様化するモンゴル世界Ⅱ, 45-57, 2013
- 24) Oyundelger Ganzorig, Futoshi Sumisa, Batjargal Batdorj, Takashi Yoshida: Isolation and Identification of new Lactic Acid Bacteria with Potent Biological Activity and Yeasts in Airag, a Traditional Mongolian Fermented Beverage. Food Science and Technology Research. Vol.22, Issue. 5, 575-582(2016)
- 25) Kaihei OKI, Jamyan DUGERSUREN, Shirchin DEMBEREL, Koichi WATANABE: Pyrosequencing Analysis of the Microbial Diversity of Airag, Khoormog and Tarag, Traditional Fermented Dairy Products of Mongolia. Bioscience of Microbiota, Food and Health, Vol.33, Issue.2, 53-64(2014)
- 26) Mari MIYAMOTO, Yasuyuki SETO, Hadjime NAKAJIMA, Sedkhuu BURENJARGAL, Altangerel GOMBOJAV, Shirchin DEMBEREL, Taku MIYAMOTO: Denaturing Gradient Gel

Electrophoresis Analysis of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Mongolian Fermented Milk. Food Science and Technology Research. Vol.16, Issue.4, 319-326(2011)

- 27) 鳥力吉徳力根・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. Vol.62, No.3, 78-83(2013)
- 28) 布仁特古斯・宮本拓・中村昇二・野坂能寛・青石晃宏：中国内蒙古自治区の馬乳酒から分離した構成乳酸菌の同定. 日畜会報. Vol.73, No.3, 441-448(2002)
- 29) 森永由紀，土屋竜太，河合隆行，ツエレンプレブ バトユン，高槻成紀，田村憲司，浅野眞希，竹内菜穂子，遠藤一樹，石井智美：モンゴル国ボルガン県モゴド郡の馬乳酒の評価点，物性値，無機成分の特徴. 日本地理学会発表要旨集. 2017s(0), 100276(2017)
- 30) 堂迫俊一，2017，新版牛乳・乳製品の知識，86-101，幸書房，東京
- 31) 栗田修，中林徹，清酒酵母とクリベロミセス属酵母との混合培養による発酵試験，三重県工業研究所研究報告，

Vol. 36, 81-84, 2011

- 32) 井上重治, 2002, 微生物と香り-ミクロ世界のアロマの力,
69-70, フレグランスジャーナル社, 東京
- 33) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田博, 清酒のにおい参照標準候
補物質の専門家による認知, 日本醸造協会誌. Vol. 105,
No. 2, 106-115, 2010
- 34) 上田悦範, 緒方邦安, 安田充, バナナ果実の香気成分、
とくにイソアミルアルコールのエステル化について, 日本食
品工業学会誌, Vol. 18, No. 10, 1971
- 35) 相根義昌, 中川純一, 戸枝一喜, 佐藤広顕, 食材の香り
と風味の研究, におい・かおり環境学会誌, Vol. 44, No. 5,
298-306, 2013
- 36) 松田譲, 有馬啓, 微生物の生産するリボキシゲナーゼ,
蛋白質核酸酵素, Vol. 25, No. 3, 193-210, 1980
- 37) Gustavo Graciano Fonseca & Elmar Heinzle & Christoph
Wittmann & Andreas K. Gombert, The yeast *Kluyveromyces*
marxianus and its biotechnological potential, Appl
Microbiol Biotechnol, Vol. 79, 339-354, 2008
- 38) Sudum, Bai Yu, Shuangquan, Wulijideligen and Taku
Miyamoto, Isolation and identification of yeasts in

- chigee, fermented mare' s milk, a traditional drink of Inner Mongolia, China, Milk Science, Vol.59, No.3, 2010
- 39) 新保里佳, ワイン醸造における野生酵母の利用と微生物DNA プロファイリング解析, 酪農学園大学卒業論文, 2015
- 40) Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T. and Demberel, S., Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia, World J. Microbiol. & Biotech, Vol.24, 1313-1325, 2008
- 41) Takada, S., Yamasaki, K., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Dashnyam, B., Ahhmed, A. M., Kawahara, S. and Muguruma, M., The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products, Anim. Sci. J., Vol.82, 571-579, 2011
- 42) ジェイミー・グッド, 2014, 新しいワインの科学, 初版, 367-388, 河出書房新社
- 43) 山本香織, パラグアイでの新規発酵乳製品の製造に向けての検討, 酪農学園大学修士論文, 2015
- 44) Yadamjav Purevdorj, Movement pattern and range

selection of mother horses kept for traditional
airag(fermented horse' s milk)production in Mongolia,
酪農学園大学修士論文, 2015

- 45) Tserenpurev BAT-OYUN, Kakehiro Y ITO, Yadamjav
Purevdorj, Masato SHINODA, Satomi ISHII, Hoshino BUHO
and Yuki MORINAGA, Movement of dams milked for fermented
horse milk production in Mongolia, Animal Science
Journal, Vol.89, No.1, 219-216, 2018
- 46) 堤 浩子, 清酒酵母の香気生成の研究, 生物工学会
誌, Vol.89, No.12, 717-719, 2011
- 47) 武田和, 牧草を添加したエメンタールタイプチーズの微
生物叢・有機酸解析, 酪農学園大学卒業論文, 2018



Fig.1 馬乳酒をサンプリングした地域の位置関係
(モンゴル国及びキルギス)

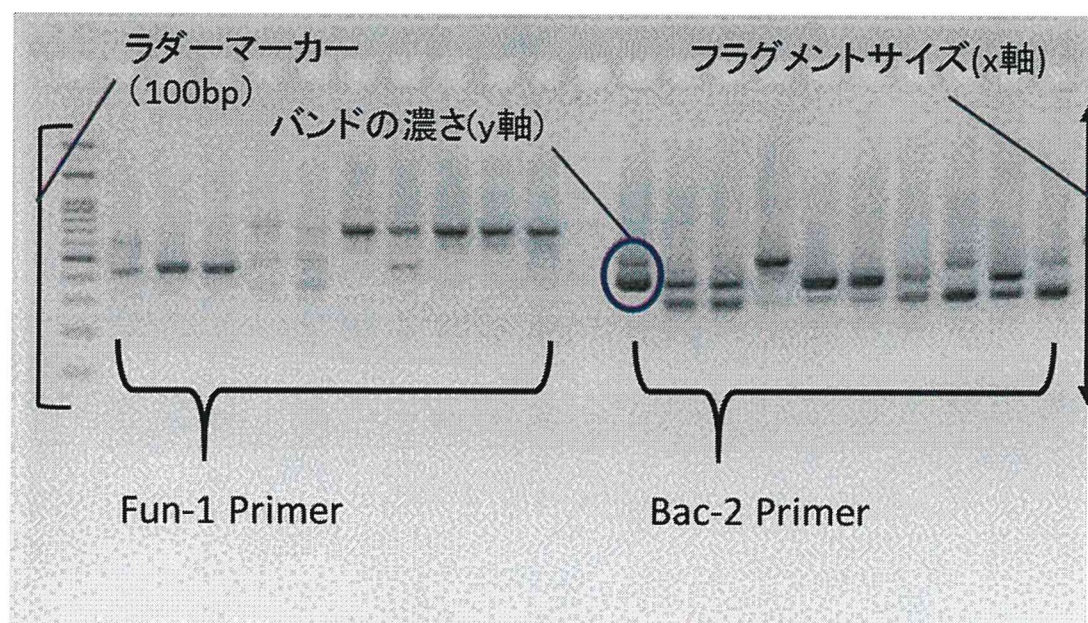


Fig.2 馬乳酒10サンプルの電気泳動結果

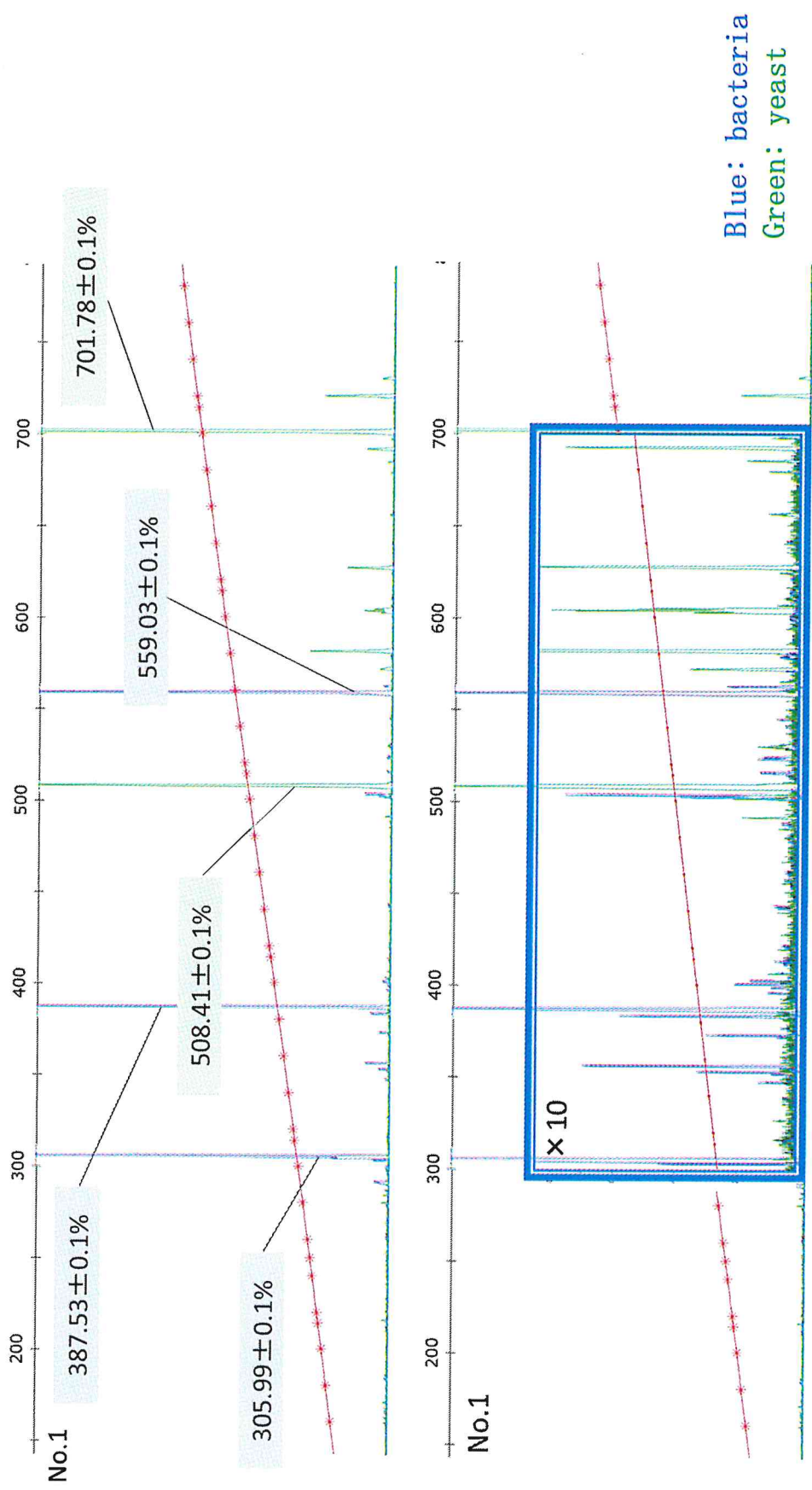


Fig.3 馬乳酒No.1(モンゴル国ウブスハンガイ県産)ARISA解析の結果(上段)及び
300-700bpを10倍拡大した解析結果(下段)

・No.1には多くの馬乳酒に共通して検出された6つのピークが全て含まれている

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

ピーク値 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	6	12
	56.52%	65.22%	21.74%	26.09%	52.17%
50 ≤	18	21	10	6	18
	78.26%	91.30%	43.48%	26.09%	78.26%

- ・1000bp以上のメジャーピークのみをカウントした結果と
50bp以上の全てのピークをカウントした結果を示した

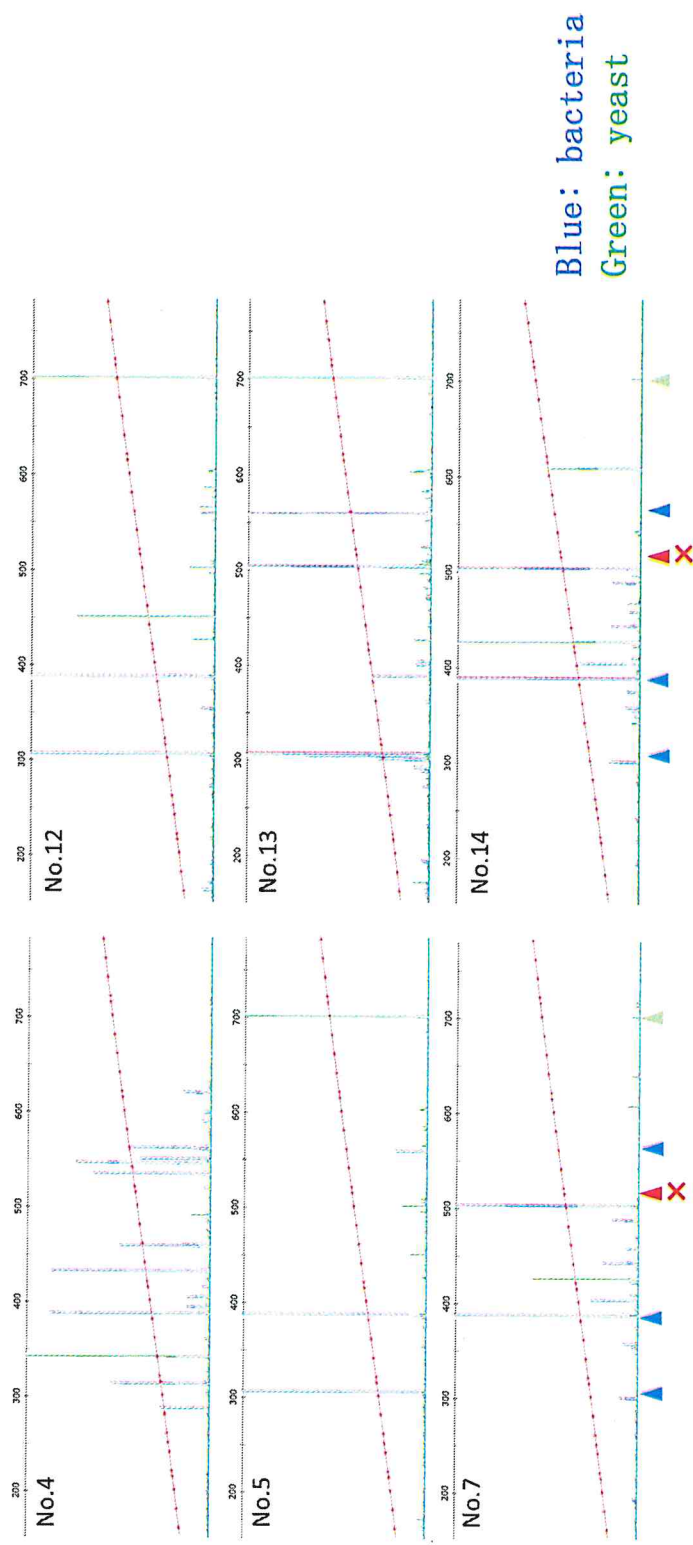


Fig.4 モゴト群産馬乳酒6サンプルの微生物叢の比較
 ・508.41±0.1%の酵母がどのサンプルにも見られなかった(▲)

Table.2 モゴト群産馬乳酒6サンプル中の主要な微生物の割合

バンドサイズ ピーク値	細菌		酵母	
	305.99±0.1%	387.46±0.1%	508.41±0.1%	701.78±0.1%
50 ≤	3	6	0	4
	50.00%	100.00%	0.00%	66.67%

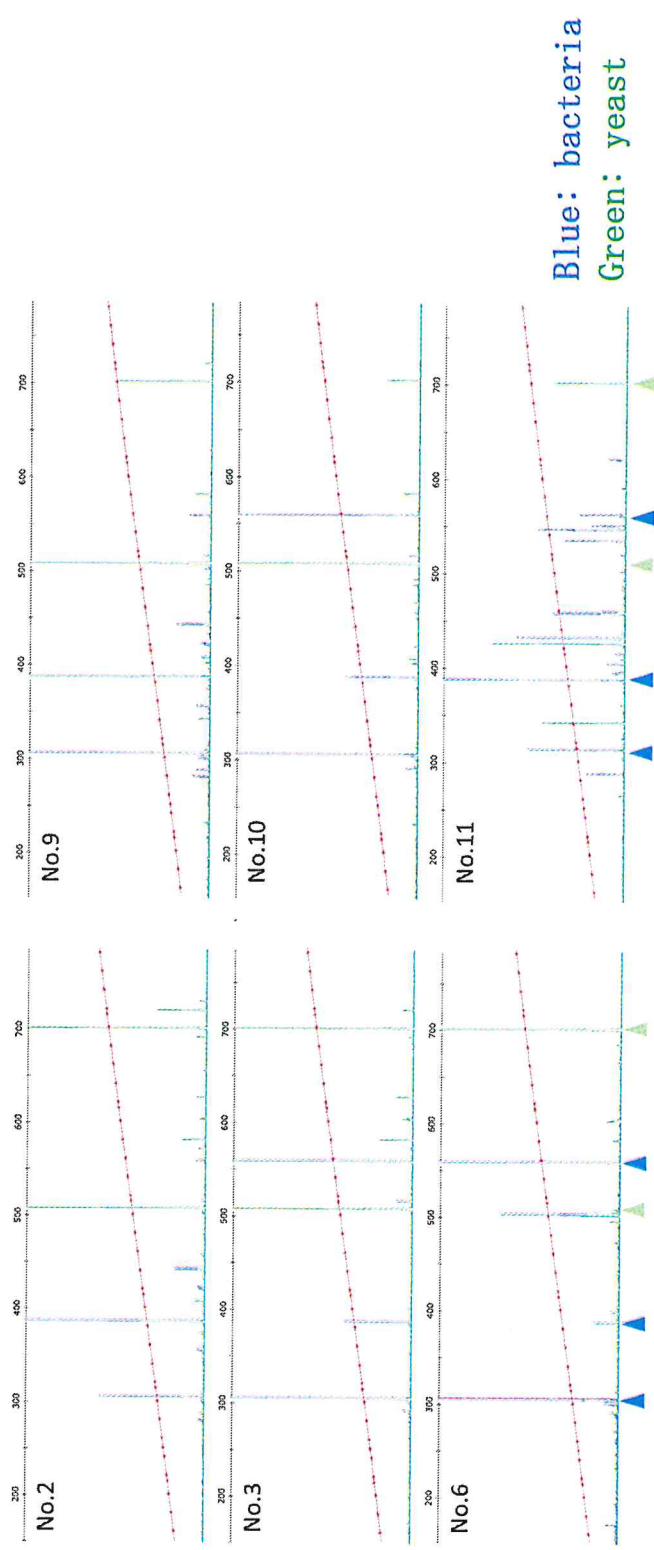


Fig.5 アルバイヘル産馬乳酒6サンプルの微生物叢の比較

・387.46±0.1%の細菌, 508.41±0.1%及び701.78±0.1%の酵母が高い割合で検出された

Table.3 アルバイヘル産馬乳酒6サンプル中の主要な微生物の割合

細菌		酵母	
バンドサイズ	ピーク値	305.99±0.1%	508.41±0.1%
50 ≤		387.46±0.1%	701.78±0.1%
		5	4
		83.33%	66.67%
		6	6
		100.00%	100.00%

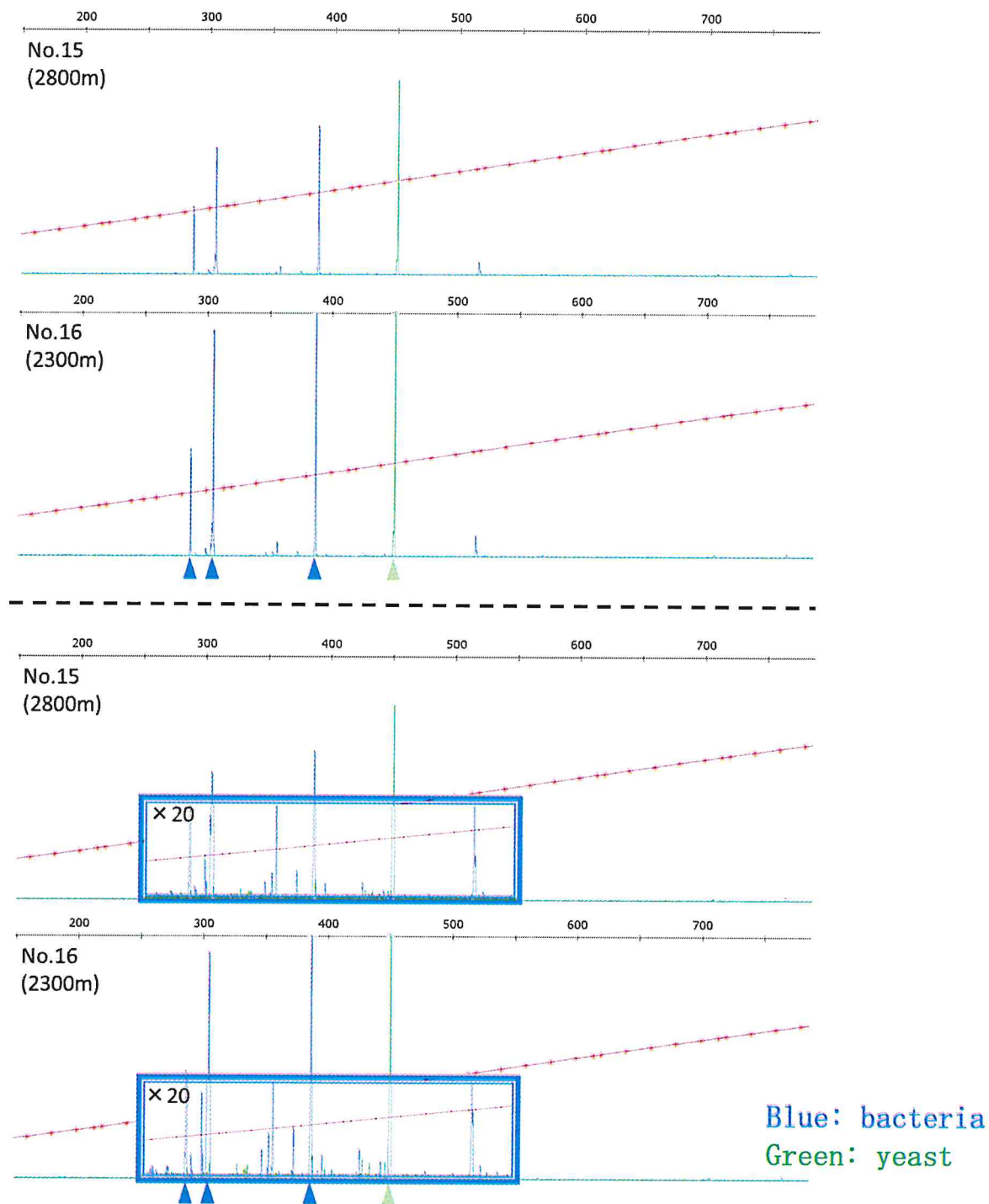


Fig.6 キルギス産馬乳酒2サンプルの微生物叢の比較(上段)及び
250-550bpを20倍拡大した場合の比較(下段)

Table.4 キルギス産馬乳酒2サンプル中の主要な微生物とピーク高の比較

バンドサイズ サンプルNo.	細菌			酵母
	$287.34 \pm 0.1\%$	$305.99 \pm 0.1\%$	$387.46 \pm 0.1\%$	$450.94 \pm 0.1\%$
No.15(標高2800m)	1104	2079	2433	3212
No.16(標高2300m)	1766	3726	4143	5207

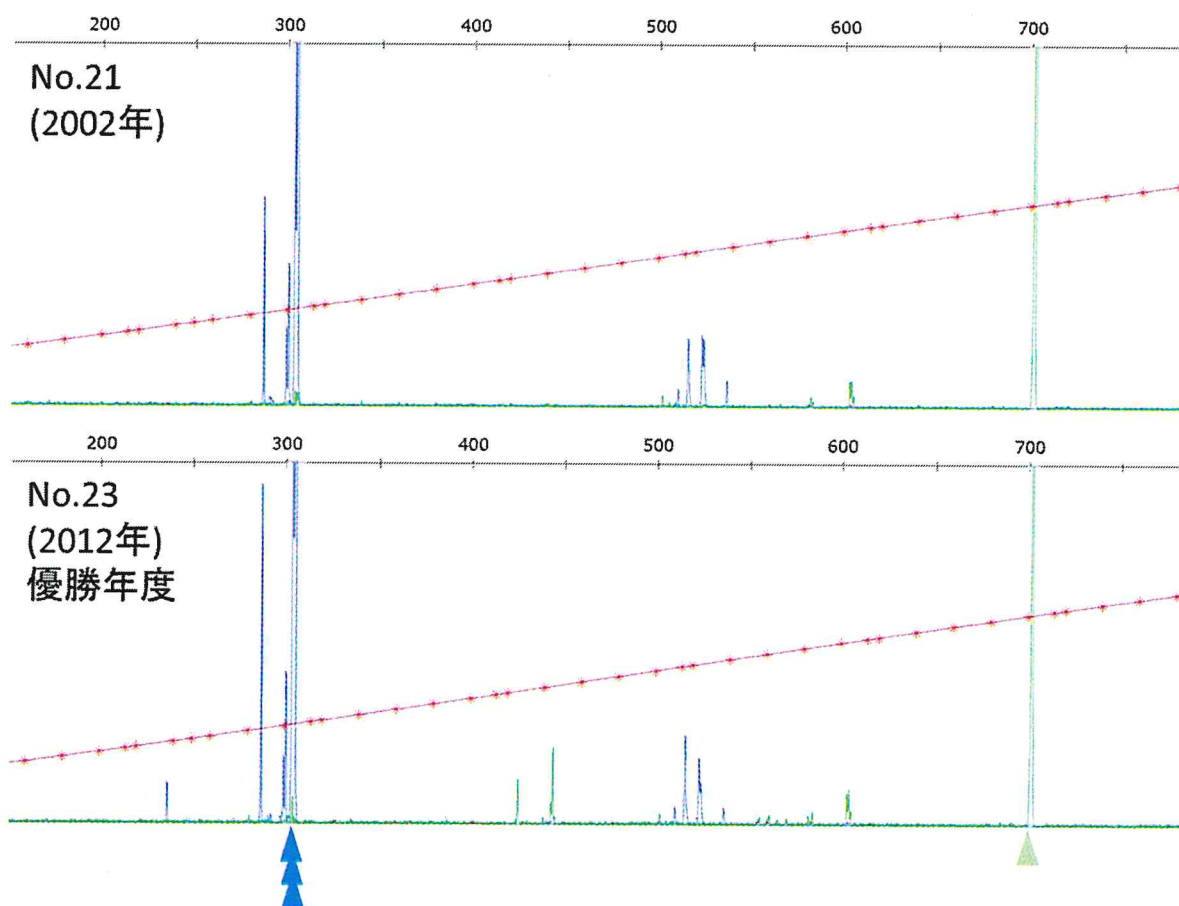
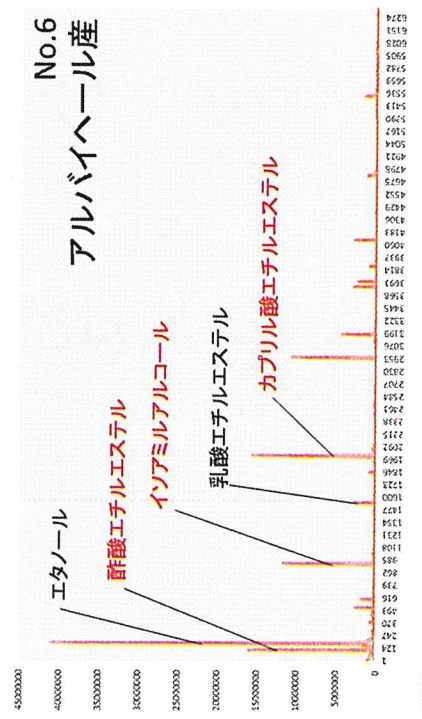


Fig.7 モンゴル国際馬乳酒コンクール
優勝宅馬乳酒2サンプルの微生物叢の比較

Table.5 モンゴル国際馬乳酒コンクール
優勝者宅の馬乳酒2サンプル中の主要な微生物とピーク値の比較

バンドサイズ サンプルNo.	細菌			酵母
	303.70±0.1%	304.73±0.1%	305.35±0.1%	701.78±0.1%
No.21(2002年度)	1316	2350	—	2709
No.23(2012年度)	2230	2241	2813	3130



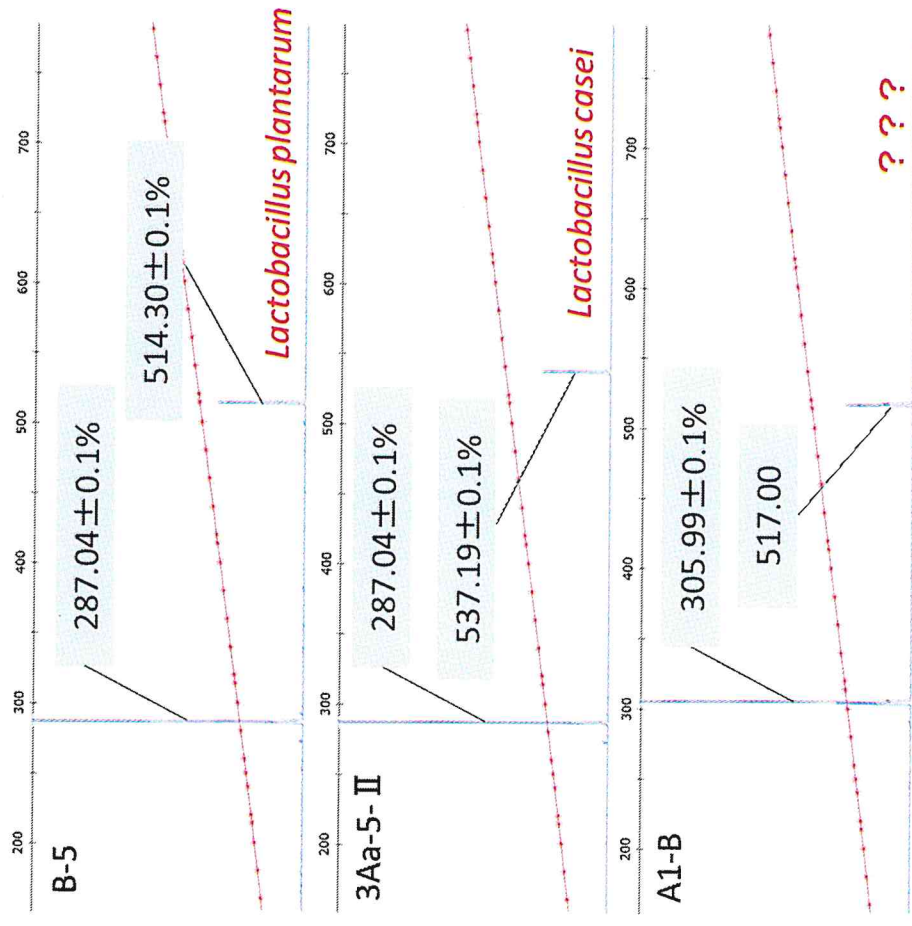


Fig.10 馬乳酒から分離した研究室保存菌株の
ARISA特異フラグメントサイズ(細菌)

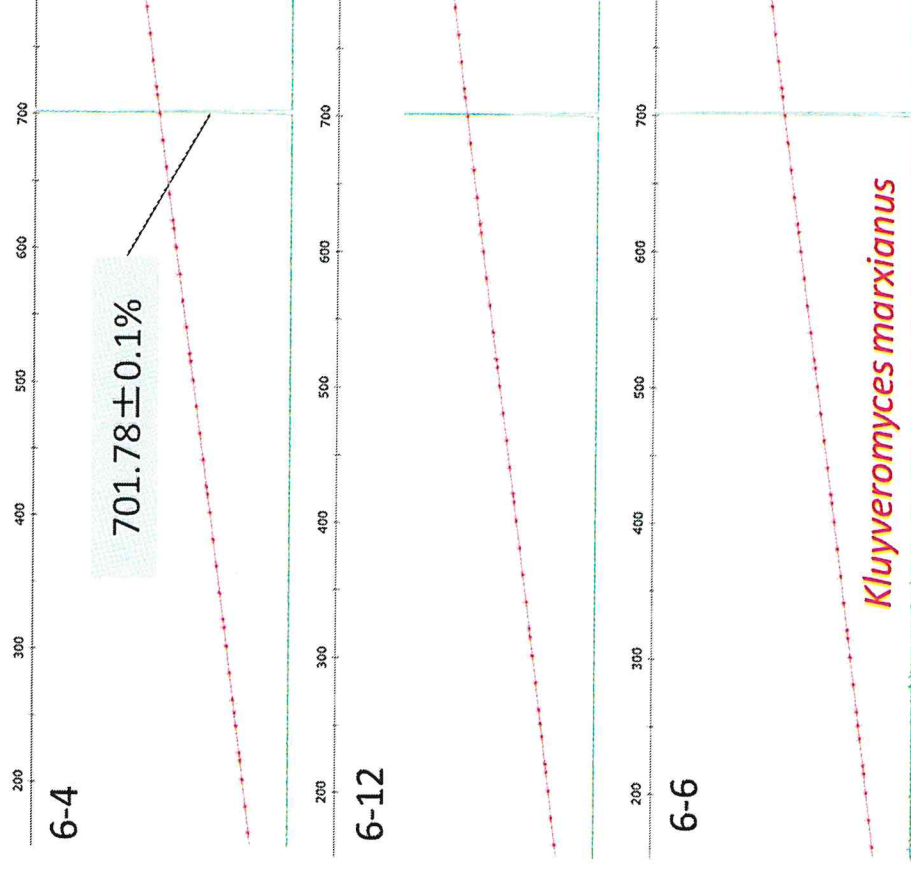


Fig.11 馬乳酒から分離した研究室保存菌株の
ARISA特異フラグメントサイズ(酵母)