

# 中国チベットにおける伝統発酵飼料・食品由来乳酸菌 の収集と分類

蔡 義民

農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

[〒329-2793 栃木県那須塩原市千本松 768]

Collection and identification of lactic acid bacteria isolated from  
traditional fermented feed and food in Tibet

Yimin CAI

National Institute of Livestock and Grassland Science,

National Agriculture and Food Research Organization

## 1. 目的

チベット高原はユーラシア大陸の中央部に広がる世界最大、最高の高原で、標高は平均 4,500 メートルであり、昼夜の温度差は大きく、空気は希薄で酸素含有量が少ないなど高原特有の生態システムを有している。微生物の資源も豊富であり、伝統的な方法で作られている発酵飼料（サイレージ）・発酵乳製品（曲拉 Qula）などにおいて利用されているが、未知・未利用な菌種も多いと推察される。

サイレージは新鮮な飼料作物や牧草などを材料とし、乳酸菌の力を巧妙に利用して調製された家畜の貯蔵飼料である（蔡, 2001; 蔡, 2002; McDonald et al 1991）。細切した飼料作物・牧草をサイロ内に詰め込んで密封し、乳酸発酵によって低 pH 状態と嫌気状態を形成することによって、腐敗の原因となる糸状菌や好気性細菌の活動が抑えられて長期保存が可能になる。現在、サイレージは主要な飼料貯蔵法として世界で広く利用されている。サイレージから見いだされる乳酸菌は多種多様であり、材料草中の可溶性糖類を基質として乳酸を生成する。これらの乳酸菌には、乳酸だけを生成するホモ型発酵をするものと、乳酸、酢酸、エタノール、炭酸ガスを生成するヘテロ型発酵を行うものがある（Cai et al., 1999; Cai et al., 1998; Cai et al., 1999; Ennahar et al., 2003; Zhang et al., 2000; Ohmomo et al., 2002）。

Qula はヤクミルクを原料とし、古い Qula 固形体をスターター菌として用いることによって作られる、堅い粒状の黄色～白色のチーズであり、チベットの伝統的な乳発酵食品として 1000 年間以上の歴史を持つと言われている。冬季の食用タンパク質を貯蔵する重要な方法であるとともに、ヤクヨーグルトを作るためのスターターとしても使用されている (Duan et al., 2007; Elisabeth et al 2003; Gurban et al., 2006)。現在では類似品が中国チベットを始め、青海、四川、甘肅などの各省内でも広く生産されている。

本探索は、中国チベット産飼料作物、サイレージおよび伝統発酵食品(Qula)由来の乳酸菌を収集し、それら微生物の分子分類と系統保存を行うことにより、プロバイオティック乳酸菌の畜産物生産への有効活用を目的として行った。

表 1. 探索・収集日程

年 月 日	行程及び用務	用 務 先
H19. 9.6	つくば→新東京国際空港→成都	移動
9.7～9.9	四川農業大学にて野外用培地の調製・準備	四川省雅安市, 四川農業大学
9.10	成都→拉薩	移動
9.11～9.13	チベット牧場のサイレージサンプリング	西藏拉薩, チベット大学
9.14	拉薩→西寧	移動
9.15	甘肅牧場のサイレージと乳製品のサンプリング	青海省西寧市, 青海大学
9.16	西寧→蘭州→敦煌→甘肅大学試験牧場	移動
9.17～9.18	甘肅省にてサンプリング	甘肅省蘭州市, 甘肅農業大学
9.19	安西→蘭州→烏魯木齊	移動
9.20～9.22	新疆牧場にてサンプリング・乳酸菌の分離	新疆烏魯木齊市, 新疆農業大学
9.23	烏魯木齊→蘭州→鄭州	移動
9.24～9.27	鄭州大学にて分離株の純粋分離・保存	河南省鄭州市, 鄭州大学
9.28	鄭州→北京→新東京国際空港→つくば	移動

## 2. 探索概要

2007年9月6日から9月28日にかけて、中国四川省、チベット自治区、青海省、甘肅省、新疆ウイグル自治区などの中国チベット高原地域5カ所で探索を行った(表1, 図1)。現地の牧場や農家を訪問し、伝統発酵飼料(サイレージ)・発酵乳製品(Qula)を採集した(図2, 図3)。収集したサンプルは真空パックで密封し、冷蔵した状態で実験室へ速やかに持ち帰り、乳酸菌の分離・培養を行った(図4)。



図1. 中国における採集地

● : 採集地

## 3. 収集成果

### 1) 乳酸菌の分離

分離源のサンプリングを行う際は、100g ずつ無菌的に採取し、ポリ袋に入れて密封した。さらに、菌叢の変化を最小限にとどめるために、試料を採取してから乳酸菌の分離操作に取りかかるまでの経過時間をできるだけ短くするとともに、運送中は可能な限りアイスボックスを利用して低温を保った。

収集した各試料を10g 計りとしてストマッカー用ビニール袋に入れ、滅菌した生理食塩水90 mlを加えてから激しく振とうして10倍希釈液とし、さらにこの希釈液を $10^{-8}$ まで段階希釈して分離に供した。乳酸菌はGYP白亜寒天培地(小崎ら, 1992), MRS

寒天培地および酢酸寒天培地（山里ら，1986）などを使用し，30℃嫌気培養ジャーで2～3日間培養して分離した．形成されたコロニーから，グラム染色陽性やカタラーゼ反応陰性を示すものを選び，純粹分離を行った．

### 2) 乳酸菌の保存

乳酸菌の保存には，一般の微生物保存と同じように，継代培養保存法，凍結保存法および凍結乾燥保存法が用いられる．今回の探索・収集では，継代培養保存法と凍結保存法を用いた．

乳酸菌の継代培養には MRS を使用した．乳酸菌は乳酸を生成するので，寒天培地に酸の中和剤として沈降性炭酸カルシウムを添加した．白金線の先端で乳酸菌コロニーをとり，その白金線を高層培地の中心部を通過させるようにして試験管の底に到達するまで刺した後，乳酸菌の至適温度で培養した．穿刺溝に沿った乳酸菌の生育が確認された時点で，その試験管を 5℃の冷蔵庫に入れて保存した．この状態で2～3か月間，保存が可能である．

凍結保存については，MRS 寒天培地に生育したコロニーを滅菌綿棒で集め，10%Dimethyl sulfoxide を入れた NA 液体培地（Bacto-Beef Extract 3 g + Bacto-Peptone 5 g/l）に懸濁し，数本のチューブに小分けして-80℃のディープフリーザーに入れて保存した．復元させるときは，凍結した培地を室温程度でゆっくりと解凍した後，白金耳で MRS 寒天培地に塗抹して至適温度で培養した．

### 3) 乳酸菌の同定

純粹分離した菌株に対してグラム染色，形態観察，カタラーゼ反応，孢子形成，ガス生成及び乳酸生成に関する検査を行った．炭水化物発酵パターンは API 50CH を用い



図 2. バンカーサイロによるサイレージ調製（甘肅）



図 3. 酪農家産 Qula（チベット林芝市）



図 4. アネロバック角形ジャーによる乳酸菌の培養

て分析した.

菌種の同定は, 16S rDNA シーケンス解析に基づいて系統樹を作成することによって行った. すなわち, MRS 寒天培地で培養した菌体を N-Acetylmuramidase (生化学工業) と Lysozyme (生化学工業) などの酵素処理と界面活性剤で溶菌させ, 菌体からゲノム DNA を抽出した. 得られたゲノム DNA を鋳形としてプライマー 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3'), TaKaRa Taq キット (宝酒造) および GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用し, PCR によって 16S rDNA の塩基配列約 1500 bp を増幅した. PCR 産物は DNA 回収用フィルター付遠心チューブ (SUPREC-02, 宝酒造) を用いて精製した. シークエンス反応および産物の精製は BigDye Primer Cycle Sequencing Kit と GeneAmp PCR System 9700 を使用し, Applied Biosystems のプロトコールに従って行った. DNA 塩基配列の解析には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を使用した. 得られた 16S rDNA の配列は BLAST Homology Search (Altsuchul et al., 1997) を用いて DNA データバンク (GenBank/EMBL/DDBJ) に対して検索を行った. 分離菌株と近縁基準株との分子系統樹は, CLUSTAL W プログラム (Thompson et al., 1994) を使って配列間の進化距離を計算し, 近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) により作成した.

#### 4) 結果

四川, チベット, 青海, 新疆など中国チベット高原地域からサイレージと Qula サンブルを収集し, 分離した乳酸菌を整理して MAFF に登録した (表 2).

サイレージ材料草 Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*), アルファルファ (*Medicago sativa*) および トウモロコシ (*Zea mays*) から 10 菌株を分離した. すべての分離株はグラム染色陽性, カタラーゼ反応陰性, グルコースから多量の乳酸を生成する桿菌あるいは球菌であった. 細胞形態および生理生化学性状にもとづいて分離株を A~F グループに類別することができた.

グループ A (MAFF211717, MAFF211720) はグルコースからガスを生成しないホモ発酵型の乳酸桿菌であり, 主に DL 乳酸を生成する. グループ B (MAFF 211718) はグルコースからガスを生成するヘテロ発酵型乳酸桿菌である. グループ C (MAFF 211719, MAFF 211721) はグルコースからガスを生成するヘテロ発酵型で, 主に D(-) 乳酸を生成する乳酸球菌である. グループ D (MAFF 211722, MAFF 211726) はグルコースからガスを生成しないホモ発酵型で, 主に L(+) 乳酸を生成する乳酸球菌である. グループ E (MAFF 211723, MAFF 211725) はグルコースからガスを生成するヘテロ発酵型で, 主に D(-) 乳酸を生成する乳酸球菌である. グループ F (MAFF 211724) はグルコースからガスを生成するヘテロ発酵型であり, 主に L(+) 乳酸を生成する乳酸球菌である.

16S rDNA の解析結果に基づき, 以上の分離菌株は *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

表 2. サイレージ乳酸菌の性質ならびに MAFF 登録番号

MAFF 番号	菌種名*	分離源	細胞 形態	発酵形式	乳酸 異性体	株名
211717	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sainfoin	桿菌	ホモ	DL	CW 11
211718	<i>Lactobacillus brevis</i>	Sainfoin	桿菌	ヘテロ	—	CW 12
211719	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	アルファルファ	球菌	ヘテロ	D(-)	CW 13
211720	<i>Lactobacillus plantarum</i>	アルファルファ	桿菌	ホモ	DL	CW 14
211721	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	アルファルファ	球菌	ヘテロ	D(-)	CW 15
211722	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	アルファルファ	球菌	ホモ	L(+)	CW 16
211723	<i>Weissella paramesenteroides</i>	トウモロコシ	球菌	ヘテロ	D(-)	CW 40
211724	<i>Enterococcus mundtii</i>	トウモロコシ	球菌	ホモ	L(+)	CW 41
211725	<i>Weissella paramesenteroides</i>	トウモロコシ	球菌	ヘテロ	D(-)	CW 43
211726	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	トウモロコシ	球菌	ホモ	L(+)	CW 44

\*: 16S リボソーム DNA の全領域塩基配列の分析結果に基づいて菌種を同定した。

*Weissella*, *Lactococcus*, *Enterococcus*属に属することが明らかとなった。さらに、詳細な分子系統解析に基づいて、グループA~Fはそれぞれ*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Weissella paramesenteroides*および*Enterococcus mundtii*に同定することができた。

Qulaからの分離株は、すべてグラム染色陽性、カタラーゼ反応陰性、グルコースからガスを生成するヘテロ発酵型で、主にD(-)乳酸を生成する乳酸球菌である。これらの菌株はMRS液体培地において、pH 3.0~9.0、温度10°C~45°C、6.5% NaCl(W/V)条件下で生育する。16S rDNAの全領域塩基配列の解析結果に基づき、これらはすべて*Leuconostoc mesenteroides*と*Leuconostoc pseudomesenteroides*に同定された。

#### 4. 所感

近年、プロバイオティック乳酸菌が腸内菌叢の維持と調節に重要な意味を持ち、宿主の健康に深く関わっていることが明らかとなってきた。すわなち、整腸作用、免疫賦活、抗腫瘍性、抗変異原、血清コレステロール低下作用、血圧低下作用など、宿主の生体防御機構を活性化するさまざまな機能を有していることが認められつつある(Tannock, 1999)。これらの作用機作を解明し、その機能を有効に活用するためには、有用な菌株の探索や発掘を行うことがきわめて重要である(蔡, 2005; 蔡, 2006; 富田, 2000)。今回、分離された乳酸菌については、そのプロバイオティック機能を詳細に解明し、良質な飼料の調製加工や健全な家畜の生産技術の開発に役立てていきたい。

Qula から見出された微生物については、古くから多数の研究がなされているが、その菌叢は入手先によって相当な違いがあると報告される (Duan et al., 2007)。これは Qula がチベットから各地に伝播していく過程において、含まれる菌種の構成が変化し、伝搬経路ごとにさまざまな多様性が生じたためであると考えられる (Duan et al., 2007)。今回、Qula から分離された菌株は、生理生化学および遺伝学的性状から、*Leuconostoc* 属の菌種に同定された。これらの乳酸菌は、Qula 生産・貯蔵過程において、有害微生物の増殖を抑制するとともに、Qula チーズの品質と風味を向上させる上で寄与していると思われる。分離された乳酸菌の機能と Qula チーズ品質の関係について今後検討する予定である。

#### 5. 謝辞

本探索の調査地点の選考並びに現地での探索において、四川農業大学張新全教授、陳琼氏、チベット大学強巴央宗教授、羅章教授、甘肅農業大学魏臻武教授、新疆農業大学艾尼瓦尔教授、鄭州大学秦広雍教授に多大なご支援を頂いた。乳酸菌の分離と保存には鄭州大学談重芳助教授、段宇珩博士にご協力を頂いた。ここに記して深く感謝の意を表する。

#### 6. 参考文献

- 1) Altschul, S.F., Madden, T.F., Schaffer, A.A., Zhang, J., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- 2) Cai, Y. (1999) Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 82: 2466-2471.
- 3) 蔡義民 (2001) サイレージ乳酸菌の役割と高品質化調製. *日本草地学会誌* 47: 527-533.
- 4) 蔡義民 (2002) サイレージ発酵の微生物的制御. *土と微生物* 56: 75-83.

- 5) 蔡義民 (2005) プロバイオティック乳酸菌を利用した飼料調製加工技術. 畜産の研究 59: 241-246.
- 6) 蔡義民 (2006) サイレージ調製における微生物研究利用. 畜産の研究 60: 369-375.
- 7) Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y. and Nakase, T. (1999) Characterization and Identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2901-2906.
- 8) Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., Ohmomo, S., Kumai, S. and Nakase, T. (1998) Influence of *Lactobacillus* spp from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp from forage crops on silage fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2982-2987.
- 9) Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Qin, G., Huo, Y. and Cai, Y. (2008) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 51-60.
- 10) Elisabeth, M.B., Bester, B.H. and Mostert, J.F. (2001) The microbiology of South African traditional fermented milks. Int. J. Food Microbiol. 63: 189-197.
- 11) Ennahar, S., Cai, Y. and Fujita, Y. (2003) Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 444-451.
- 12) Gurban oglu, Gulahmadov S., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J., Alekper oglu, Kuliev A. and Haertie, T. (2006) Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheeses. Eur. Food Res. Technol. 224: 229-235.
- 13) McDonald, P., Henderson, N. and Heron, S. (1991) The Biochemistry of Silage 2nd ed. Chalcombe Publications Berkshire. pp.11-162.
- 14) Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H. and Cai, Y. (2002) Silage and microbial performance, old story but new problems. Japan Agricultural Research Quarterly 36: 59-71.
- 15) 小崎道雄・内村泰・岡田早苗 (1992) 乳酸菌実験マニュアル. 朝倉書店, 東京. pp. 34-64.
- 16) Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- 17) Tannock, G.W. (1999) Probiotics -A Critical Review. Horizon Scientific Press, Norfolk, pp.1-4.
- 18) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.

- 19) 富田房男 (2000) 乳酸菌のニューバイオテクノロジー：乳酸菌研究の動向. *HEALTH DIGEST* 15: 1-8.
- 20) 山里一英・宇田川俊一・児玉徹・森地敏樹 (1986) 微生物の分離法. *R and D プランニング*, 東京. pp. 435-444.
- 21) Zhang, J., Cai, Y., Kobayashi, R. and Kumai, S. (2000) Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1455-1460.

### Summary

The preservation of forage crops as silage depends upon the production of sufficient acid to inhibit activity of undesirable microorganisms under anaerobic conditions. The epiphytic lactic acid bacteria (LAB) that naturally present on forage crops convey sugar into lactic acid in the ensiling process. It is well established that LAB play an important role in silage fermentation. LAB is a major component of the microbial flora which lives in various types of forage crops. The LAB commonly grows with other plant-associated microorganisms during silage fermentation, and they generally define the fermentation characteristics of silage. Sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*), alfalfa (*Medicago sativa*) and corn (*Zea mays*) are the most important grasses and forage crops in the northwest China. Epiphytic microflora, the microorganisms naturally present on forage crops, are responsible for silage fermentation and also influence silage quality. In this study, isolation and identification of epiphytic LAB on these forage grasses and crops were studied. The LAB isolates were identified biochemically, and representative strains were identified at the molecular level using 16S rDNA sequence analysis. Ten strains of gram-positive bacteria isolated from Sainfoin, alfalfa and corn in the northwest area of China, were classified and subjected to phenotypic and genetic analyses. According to morphological and biochemical characters, these lactic acid bacterium (LAB) isolates were divided into six groups (A-F) and their presumptive strains were identified as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Weissella paramesenteroides* and *Enterococcus mundtii*, based on 16S rRNA gene sequence analysis.

## 微生物遺伝資源の調査プロフィール



屋久島の森林土壌から分離された  
*Veronaeopsis simplex* の菌叢 (成澤)



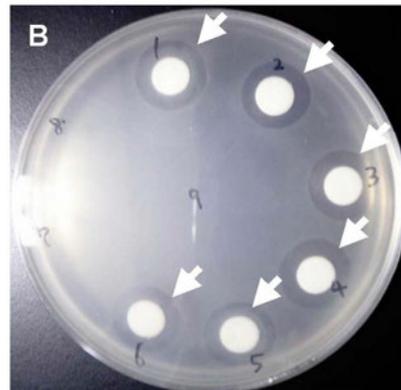
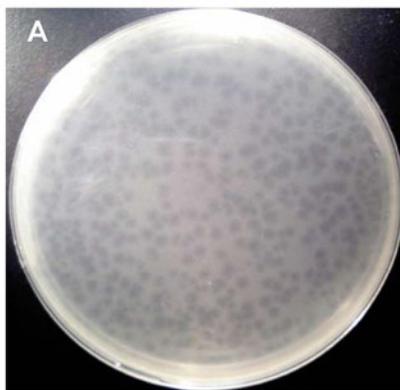
キクわい化病の発生状況  
(中央下の生育不良株) (松下)



チベットの伝統的発酵食品である Qula  
から分離された微生物の菌叢 (蔡)



ミャンマー連邦 Shan 州の高原地帯では陸稲  
の多くでいもち病が発生していた (林・入江)



A : 青枯病菌ファージによるプラーク  
B : ディスク法による溶菌特性の確認 (浅川)