

# ケニア産発酵乳マジワララから分離した乳酸菌の 生産する生理活性物質に関する研究

浦 島 匡

生物資源科学科生物資源利用学助教授

## 1. 目 的

発酵乳は放牧の始まり以来の歴史を持つ食品であり、元来、環境に由来する空気中落下細菌が、乳中で増殖してできた自然的な産物であった。今日では、ヨーグルトなど多くの発酵乳は、特定のスターターを用いた厳格な微生物管理による近代的方法で製造される食品となっている。ヨーグルトに使用される乳酸菌の菌株には、血中コレステロール低下作用や摂取者への免疫増強機能などの効果が認められているが、このことから機能性を具備した食品として、今後の食生活の中における発酵乳の比重は、ますます高くなっていくものと予想されている。

一方、世界各地では現在も伝統的な自然発酵法によって作られている発酵乳が、数多く存在している。ケニア、マサイ族の発酵乳マジワララもその一つである。それは、木の枝の先端を焼いた灰で殺菌したヒョウタンの中に牛乳を入れ、自然発酵させたものである。そのような発酵乳に含まれる乳酸菌の菌株の多くは未同定であるが、未同定な乳酸菌には、未知な生理活性物質を産生している可能性が考えられる。また、自然発酵乳から分離・同定した生理活性物質を産生する乳酸菌株を使用し、機能性をより強化した発酵乳を近代的方法によって製造する応用も期待される。

本研究はこのような目的から、マジワララに含まれる乳酸菌菌株の分離・同定、ならびに分離された乳酸菌株の産生する菌体外成分の機能性の解析を行った。

## 2. 実験方法

試料としたマジワララは、1996年にケニアの首都ナイロビから西へ260 km離れたナローク周辺のマサイ族の2家族から採取した。試料採集後直ちに研究室に持ち帰り、リンゲル液で段階希釈してSPC寒天培地、BCP寒天培地、酸性MRS寒天培地、M17寒天培地と混釈し、25℃、72時間嫌気培養した。各々の平板上のコロニーから、乳酸菌を純粋になるまで画線分離培養し、純粋になった菌株は、グラム染色、好気及び嫌气的条件下での生育試験、カタラーゼ試験、運動性試験、生育温度試験、耐塩性・好塩性試験、初発pH試験、リトマスミルク試験、グルコースからのガス発生、スクロースからのデンプン形成、アルギニンからアンモニア生成、ブドウ糖分解形成試験、生育曲線、炭水化物利用試験によって同定した。

ついで同定された菌株から、きょう膜形成菌を選抜し、部分除タンパクホエー培地を用いて培養した後、培養液からエタノール沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、HPLCによるゲルろ過（カラム：TSKgelG 6000 WX 1）によって中性多糖、酸性多糖、糖タンパク質を分離・精製した。中性多

糖はメタノリシスした後、TMS化物のガスクロマトグラフィーで単糖組成を調べた。

上の各種分離成分は、C 57 BL/6 J マウスの脾臓および胸線より調製したリンパ球の培養系に添加し、<sup>3</sup>H-チミジンを添加して 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 48 時間培養した後に、回収したリンパ球の放射線活性を測定することによって、リンパ球に対する幼若化反応（マイトジェン活性）を調べた。

### 3. 結果および考察

SPC 平板, M 17 平板, MRS 平板, BCP 平板から得られたマジワラ中の乳酸菌生菌数は、それぞれ  $1.4 \times 10^9$  cfu/ml,  $1.3 \times 10^9$  cfu/ml,  $1.1 \times 10^9$  cfu/ml,  $1.3 \times 10^9$  cfu/ml で平均約  $1.3 \times 10^9$  cfu/ml であった。一般に、国内発酵乳の生菌数は  $1.1 \times 10^7$  cfu/ml 以上と乳等省令で定められているが、この値よりもマジワラの菌数ははるかに高い。

2 家族で試料採集したマジワラに含まれる乳酸菌種の菌叢は図 1 に示したように、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* dextranicum の 2 菌種で 90% 以上を占め、マジワラはこの 2 菌種によって形成される発酵乳と特徴づけられた。この 2 菌種のうち、*Lc. lactis* は主にマジワラのカード形成、*Leu. dext.* はフレーバー形成に関わっていることが、これらの菌種を用いた発酵試験によって確かめられた。

各種乳酸菌株のうち、最も大きなきょう膜形成の認められた *Lc. lactis* MZW 113 の培養物から、エタノール沈殿、およびイオン交換クロマトグラフィーによって、中性多糖、酸性多糖および糖タンパク質が分離された。さらに中性多糖を HPLC によるゲルろ過に供した結果数本のピーク成分に分離され(図 2)、I、II、III と命名した成分の分子量は各々 2000 万、400 万、100 万と推定された。I、II、III の単糖組成は、I はラムノース、マンノース、ガラクトース、グルコースの存在比が 0.6 : 3.0 : 0.9 : 1.0、II はマンノース、ガラクトース、グルコース、N-アセチルグルコサミンの存在比が 3.4 : 1.8 : 1.0 : 1.0、III はマンノース、ガラクトース、グルコース、N-アセチルグルコサミンの存在比が 6.2 : 4.9 : 1.0 : 5.3 であることが示された。

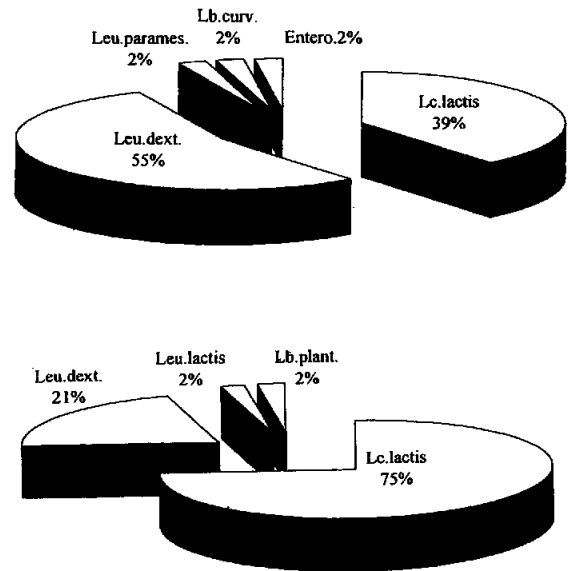


図 1. 2 家族のマジワラにふくまれる乳酸菌叢

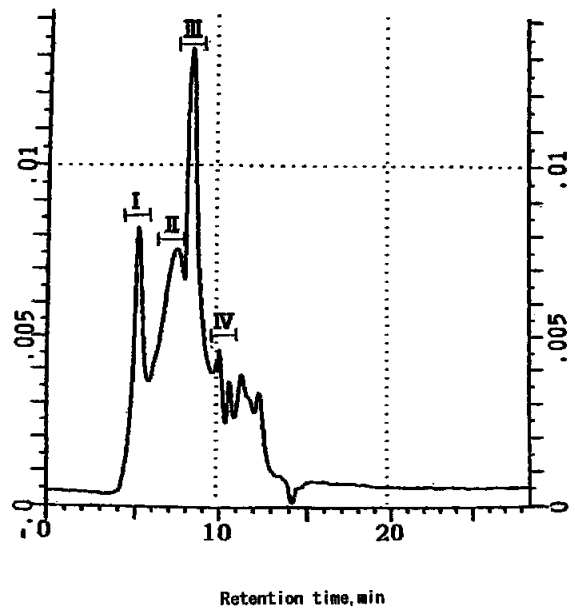


図 2. マジワラから分離した *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MZW 113 の産生する中性多糖の HPLC

Lc. lactis MZW 113 産生成分 (中性多糖 I (N1), II (N2), III (N3), 酸性多糖 (APS)) をマウス脾臓および胸腺リンパ球に対する幼若化反応に対して検査したところ, 脾臓リンパ球に対しては幼若化反応を示したが, 胸腺リンパ球に対しては反応を示さなかった。脾臓リンパ球に対する幼若化反応が最も高かったのは N1 であった (表1, 図3 参照。ConA は対照試料のコンカナバリン A, LPS はリポポリサッカライド)。この結果, Lc. lactis MZW 113 の産生する多糖にはリンパ球 B 細胞に対する幼若化作用があり, 多糖の中でもラムノースを有する分子量の最も大きな中性多糖にとくにその働きが強いことが示された。

本研究の結果, マジワラは Lc. lactis と Leu. dext. を乳酸菌スターターとし, その菌株の産生する成分には摂取者の免疫能を増強するような機能性のあることが示された。

表1. 中性多糖 N1, N2, N3 および酸性多糖の脾臓リンパ球に対するマイトジェン活性

	SI (means±S. D.)
N1	15.35± 2.97*
N2	9.70± 0.66**
N3	4.73± 0.45**
APS	9.63± 0.30**
Con-A	2.31± 0.43
LPS	117.74±45.26

\*P<0.05, \*\*P<0.01 (against Control).

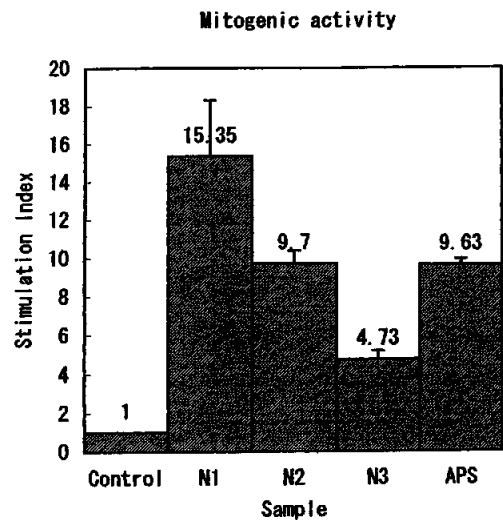


図3. 中性多糖 N1, N2, N3 および酸性多糖の脾臓リンパ球に対するマイトジェン活性