

海藻の乳酸発酵に関する研究^{*1}

内田基晴^{*2}

Studies on lactic acid fermentation of seaweed^{*1}

Motoharu UCHIDA^{*2}

Abstract Marine bio-resources have been utilized mostly by catch by mankind. In future, however, the marine bio-resources are expected to be highly utilized by developing novel fish culture skills and food processing techniques. Fermentation skills are greatly contributing to food producing and processing industries today. However, most fermented products are terrestrial origin and marine origin products are quite limited. Especially, a skill to ferment algal materials (plant materials of marine origin) has never been developed in the field of fisheries industry.

The author firstly developed a skill to perform a lactic acid fermentation of seaweed. The following is a summary of the results obtained by the present study.

- 1) *Lactobacillus brevis* strain B5201, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* strain Y5201, and *Candida zeylanoides*-related strain strain Y5206 were isolated as predominant microorganisms in a fermented material of *Ulva* spp. fronds.
- 2) A skill to perform lactic acid fermentation of seaweed was developed by a combinational use of cellulase and starter microorganisms that are composed of the above three isolates. Production of single cell products at high efficiency from algal frond tissue was observed during the fermentation of *Undaria pinnatifida*.
- 3) PCR-methods to estimate the predominance of the microorganisms added as a starter to cultures for seaweed fermentation were developed. *L. brevis* strain B5201 could be detected by use of a species-specific primer set targeted for 16S rRNA gene. Yeast strains Y5201 and Y5206 could be detected by use of an arbitrary synthesized primer OPA-3 and PCR-RAPD method.
- 4) Single use of lactic acid bacteria as a starter was effective for preventing the growth of contaminant microorganisms, while single use of yeast was not effective. Lactic acid bacteria having homo-type fermentation such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* showed high predominating ability as well as *L. brevis* in fermentation cultures of *U. pinnatifida*.
- 5) Dietary effect of fermented products of *U. pinnatifida* (marine silage) was demonstrated by rearing trials with young pearl oyster *Pinctada fucata martensii*.
- 6) Reduction of triacylglycerol concentration in serum and liver was observed for rats fed the diet supplemented the fermented *Undaria* product at 10% level for three weeks, suggesting possible utilizations of fermented materials of seaweed as new food items.

Key Words: Fermentation, Seaweed, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis*, *Undaria pinnatifida*

2005年1月21日受理 (Received on January 21, 2005)

^{*1} 京都大学審査学位論文 (掲載するに際し投稿規程に沿って一部修正した)

^{*2} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environments of Inland Sea, 2-17-5, Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan)

目 次

第1章 序 論
第2章 海藻発酵試料中の微生物相の解析と海藻発酵微生物の分離
第3章 海藻の単細胞化・乳酸発酵技術の検討
第1節 発酵培養条件の検討
第2節 大量調製、保存性の検証
第4章 発酵スターターとしての使用に適した微生物の検討
第1節 PCR法を用いた菌種同定・検出技術の開発
第1項 菌種特異的プライマーを用いた同定・検出
第2項 PCR-RAPD法による同定・検出
第2節 乳酸菌・酵母の組み合わせの検討
第3節 乳酸菌種の検討
第5章 海藻発酵素材の応用的価値に関する研究
第1節 水産餌飼料としての検討
第2節 健康機能性食品素材としての検討
第6章 総 括
謝 辞
参考文献

第1章 序 論

世界人口の増加、化石燃料資源の枯渇を背景として、近年、持続的な再生産が可能なバイオマス資源を有効利用していくことの重要性が叫ばれている。とりわけ地球の7割を占める海洋に存在するバイオマス資源は、陸上バイオマス資源に比べ、ヒトによってその利用が検討される機会に乏しく、未開拓な資源として注目される (Mann, 1973; 大野, 1996; 徳田ら, 1987)。海洋全体における第一次生産量 (炭素換算) は、その約93%が回転時間 (turnover) が速い微細藻類によるものと見積もられているが、バイオマス資源として評価した場合、全海洋植物バイオマスの2/3が大型藻類によるものと推定する報告もある (Smith, 1981)。大型藻類が生育しうる潮間帯・亜潮間帯・河口域の面積は、 $2.0 \times 10^6 \text{ km}^2$ で、全海洋面積の0.55%を占めるに過ぎないことから、単位面積あたりのバイオマス存在量は微細藻類の約360倍に相当する (Smith, 1981; 徳田ら, 1987)。また単位面積あたりの平均生産量 (炭素換算) は、 $1800 \sim 2000 \text{ gC/m}^2/\text{yr}$ で、これは陸上で生産力の高い場として知られる熱帯降雨林域に匹敵している (Daws, 1981)。従って海藻バイオマス資源は、高密度で存在していることから比較

的回収して利用しやすい資源として捉えることができる。統計量として把握されている世界の海藻生産量は、FAO発行のYearbookによれば、1983年で褐藻類が230万t (うち日本の生産量33万t)、紅藻類が82万t (日本28万t)、緑藻類その他が1万4千t (日本600t)とされている (徳田ら, 1987)。

海藻が利用されてきた歴史を振り返ると (西澤, 1989; 新崎, 新崎, 1978)、中南米やアジア諸国において、古代の原住民が海藻を食べたり薬にしたりしていたと思われる史跡が知られており、また紀元前820年頃の周の国では昆布の記述があり、海藻が古くから世界各地で食用として利用されてきたことが容易にうかがえる。一方ヨーロッパにおいては家畜の飼料や作物の肥料として海藻が利用されてきた。さらに海藻そのままではなく一部の成分を取り出して利用することもなされ始め、19世紀にはカリウム、ヨウ素等のミネラル成分を利用する本格的な海藻灰工業がおこり、また海藻の主成分である多糖類を抽出して工業利用することも始まり、現在の海藻利用産業の中心を担っている。一方、日本においても海藻を読み込んだ歌が万葉集に多数あるなど、海藻が食用として古くから日本人に利用されてきたことがわかる。海藻は、現在に至っても日本食を特徴づける健康イメージのある食材として重要な地位を保っているが、一方で海藻利用産業は、近年市場に飽和感があり、新しい利用法の開拓が強く求められている。海藻の新しい利用法としては、抗腫瘍作用、抗血圧作用、抗動脈硬化作用、抗血栓作用、抗菌作用等に着目した医薬品としての利用がさかんに研究されており (西澤, 1989; 新崎, 新崎, 1978)、将来経済的な効果に結びつくことが期待されるが、一方でこのような方向での利用は、海藻成分の一部のみを利用する 경우가多く、海藻バイオマス資源の有効利用というも目的からは、少し焦点がずれる。

このような背景のなか、微生物の能力を借りて海藻を発酵させて利用しようというアプローチは、藻体全体の有効利用につながる点、処理コストが安い点などから一般に経済的価値の低いバイオマス資源の利用法として注目される。しかし、陸上においては、植物性素材の発酵技術はかなり古くから存在し、多方面で普及しているのに対し、海洋の植物性素材である海藻の発酵技術は、歴史が浅く、バリエーションに乏しい。前述の海藻利用の歴史のなかで微生物による発酵が関与しているのは、肥料利用のための堆肥発酵とエネルギー利用のためのメタン発酵 (Gunaseelan, 1997) の2つに限られる。堆肥発酵の例としては、イタリアの観光都市ベニスに大量繁殖するアオサの堆肥化を目指した最近の研究事例 (Cuomo *et al.*, 1995) がある。

本事例では、アオサ藻体に木材チップ、藁、ピートモス等の副材を加え、3週間の微生物発酵をおこなっている。しかし、本研究では最終産物について肥料有効成分の分析が行われているのに対し、微生物学的な観点からの解析はほとんどなされていない。また、得られた発酵肥料の実用的価値も明らかでない。一方、メタン発酵によるエネルギー利用の検討は、最初アメリカにおいて1976年からアメリカエネルギー省およびガス研究所の委託のもとで大規模に行われ、また日本においても1981年から3年間、通商産業省の委託のもとで行われた。これらの研究のなかで、海藻を強力にメタン発酵させる菌の分離・培養に成功し、10~100Lの中間規模での発酵試験にも成功したが、副産品回収コストも含めてのエネルギー収支見積もりは、マイナスにとどまり、実用化へのネックとなっている(西澤, 1989)。東南アジアでも、大量繁殖するアオサ類を基質としたメタン発酵が検討されたが、やはり研究レベルに留まっている(Sivalingam, 1982)。以上概説したように、海藻の利用の歴史の中で、発酵という言葉は、ほとんど実用的価値を発揮してこなかった。

次に、海洋微生物とその発酵利用という観点から概説する。海洋環境下においても、乳酸菌(Frantzmann *et al.*, 1991; Gatesoup, 1999)、酵母(Taysi and Uden, 1964; Urano *et al.*, 1998)等の発酵に関与する微生物が分布していることが既に知られている。最近では、好・耐塩性、好・耐アルカリ性を特徴とする海洋乳酸菌 *Marinilactibacillus psychrotolerans* が分離され、海洋特有の乳酸菌の存在も知られるようになった(Ishikawa *et al.*, 2003)。海産酵母については、海藻が生育している場所において高頻度で分離されること(Fell *et al.*, 1960)、海藻が分泌する有機物を利用できること(Suehiro and Tomiyasu, 1962)が明らかにされており、生態的に海藻と密接な関係にある海洋における定住者であると位置づけることができる。しかし、全体としてみれば、海洋環境から分離される微生物の大部分はグラム陰性菌であり、乳酸菌、酵母等のグラム陽性菌の分布割合は、一般に非常に少ない。海洋環境から分離されたこれらの乳酸菌や酵母が、発酵分野で利用された例は、さらに限られる。近年、日本国内において海洋より分離された酵母がパンや酒類の製造に利用され話題となったが(小玉, 2003)、これなどは海産微生物が発酵分野で利用された貴重な事例といえる。この例で利用された菌は *Saccharomyces cerevisiae* であり、必ずしも海産酵母の典型種とはいえないが、今後さらに検討が行なわれることにより、陸生起源の微生物にない特徴を有する海産微生物が、発酵に利用されて、発酵産業が多様化していくことが

期待される。

本稿では、海藻試料より分離した乳酸菌、酵母をスターターとして利用して、セルラーゼによる糖化処理と組み合わせて著者が開発した海藻の乳酸発酵技術に関する知見と、本技術により得られる海藻発酵素材の今後の産業利用の可能性についてまとめる。

第2章 海藻発酵試料中の微生物相の解析と海藻発酵微生物の分離

農林水産分野での人と発酵の関わりは多岐にわたり、農業における堆肥製造や畜産業におけるサイレージ生産など食糧生産の場において発酵は、重要な役割を演じている。また、発酵は、食品素材に多様性を与え、民族文化の形成にも多大な影響を与えている(Ishige, 1993; 石谷, 1995; 一島, 1997)。食糧・食品生産に関わる発酵産物は、動物性(特に乳)素材を発酵させたものと植物性素材を発酵させたものに分類することができる(Fig. 1)。陸系生物素材については、動物性、植物性ともに発酵産物が豊富に存在する。しかし、海洋系生物素材については、鰹節、魚醤油のように魚を発酵させた食品素材は、わずかながら存在するものの、植物性素材である海藻類、微細藻類を発酵させた食品は、見当たらない(Steinkraus, 1993)。また、農業の堆肥技術や畜産業のサイレージ飼料に相当する発酵技術を利用した肥料・飼料素材も水産分野にはみあたらない。これらの原因は、乳酸発酵やアルコール発酵のような食糧生産分野に応用できる種類の発酵技術が、これまで海洋系の植物性素材を基質として充分に開発・検討されていないことに起因すると考えられる。

著者らは、これまで海藻を単細胞化することにより、水産初期餌飼料素材として利用できないかというテーマに取り組んできた。海洋環境中には、海藻葉体を分解する能力を有した細菌が広く分布しており(Uchida and Nakayama, 1993; Uchida *et al.*, 1995)、強力な海藻分解能を有する好気性の従属栄養細菌 *Pseudoalteromonas atlantica* AR06株(Uchida *et al.*, 2002)を葉体に作用させた実験から、海藻は微生物による分解を受ける過程において細胞単位で壊れ易いということを観察した(Uchida, 1996; Uchida and Numaguchi, 1996)。この細菌の分解作用により産生された単細胞性の海藻粒子は、アルテミアに対して一定の餌料効果を有することが証明され(Uchida *et al.*, 1997a; Uchida *et al.*, 1997b)、海藻を単細胞化することにより、微細藻類の代替となるデトライタス性の餌料素材を得られないかという考えを持つに至

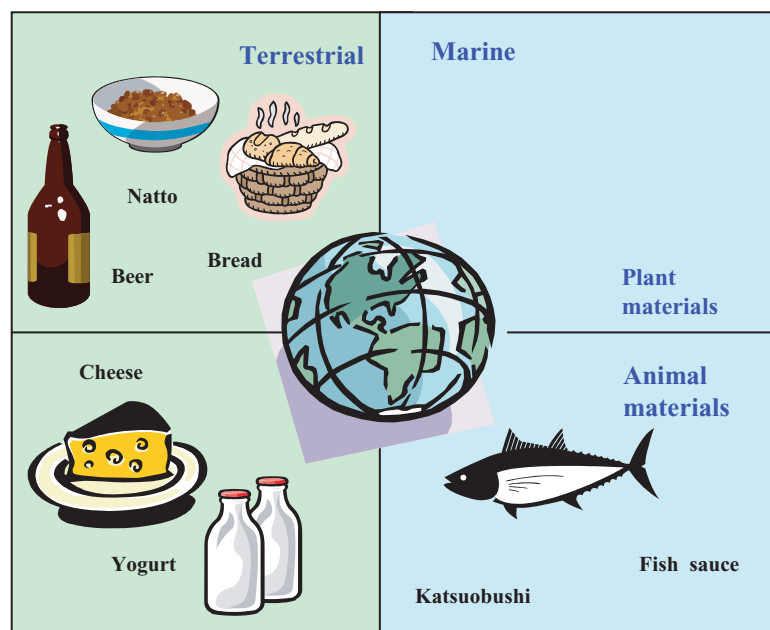


Fig. 1. Categories of fermented food products

った (Uchida, 1999)。しかし、好気性従属栄養細菌を海藻単細胞化餌料の生産に使用した場合、細菌自身による消費のため餌料粒子の減耗が調製時および保存中におこり (Uchida *et al.*, 1997a), 保存性の向上をどうするかという点が実用化に向けての問題とされた。さらに海藻分解能を有する好気性従属栄養細菌を使用して調製した餌料を開放系で投与した場合には、養殖ノリへの影響を考えるなどリスク評価という難しい問題が生じる。そこでこれらの問題点を克服或いは避けるために、海藻を従属栄養細菌により好氣的に分解、即ち海藻に対して強制的腐敗ともいふべき処理をして利用するのではなく、発酵処理をして利用することができないかという方向を検討した。しかし、海藻を発酵させることに関する研究としては、前述のようにエネルギー生産の分野におけるメタン発酵の例しか研究らしい前例がないのが現状であった。即ち我々の知る限り、海藻そのものを発酵させる技術としての乳酸発酵、アルコール発酵、酢酸発酵等は、これまでに研究例がなく、糖質源を加えての検討例 (テルモ株式会社, 1991等) が特許出願として数例あるのみであった。

一方、上記の海藻を細菌により分解し単細胞化して餌料素材化する研究を実施する過程で、対照餌料として細菌を使用しないでセルラーゼ処理により単細胞化したアオサ試料を調製して飼育試験に供していたが、このセルラーゼ処理したアオサ試料を低温下に放置すると、芳香感のある発酵臭が自然発生する現象を実験室で偶然観察した。さらに、その発酵試料をセルラー

ゼ処理した新しいアオサ藻体に移植すると芳香が発生することが再現されることを認め、発酵らしき現象を誘発するためのスターターとして機能する微生物がこの海藻試料中に存在していることが示唆された。しかし、海藻の発酵に関する知見は、上述の通り極めて乏しく、また海藻に含有される糖質は一般に陸上の糖質と大きく異なるため、ここで芳香臭の発生だけを頼りとして観察された発酵は、これまで知られているものと異なる全く新しい種類の発酵現象である可能性も考えられた。そこで、海藻を発酵させるためのスターターとして利用できる未知の微生物を分離する目的で、アオサ発酵試料中の微生物相を培養できない微生物の存在も視野に入れながら、詳細に調べることにした。

方法

海藻発酵試料の調製

実験室において得られたアオサの発酵試料を数ヶ月ごとに継代した記録を Table 1 に示す。基質であるアオサ藻体は横浜市海の公園の砂浜で採取し、水道水で洗って巻貝等、表面の付着生物を除去したものを使用した。発酵試料 No. 1 および No. 2 は異なる日に採取した新鮮なアオサ藻体を使用し、試料 No. 3 から No. 5 (A-E) までは、No. 1 と同じロットの藻体を凍結 (-40°C) 保存したものを使用して調製した。試料 No. 1 の調製は、まず藻体を 4 倍量のオートクレーブ処理した自然海水 (SSW) に懸濁し、ミキサー (MK-K75, National) で 5 mm 角程度に裁断し

Table 1. Transfer records of fermented *Ulva* cultures

Cultures	Date of prepn	Approximate compositions of <i>Ulva</i> cultures (w/w)			Incubation for degradation	Seed transfer size (v/w) and culture conditions	
		<i>Ulva</i> (wet basis)	Enzyme for degradation	Other components		Seed	Culture conditions
No. 1	1997/5/2	Fresh (11%)	Cellulase R-10 (0.22%) Abalone acetone powder (0.22%)	Autoclaved seawater (44%)	5°C, 48h	-	Degraded frond products were collected, washed and left for 17 months at 2°C.
No. 2	1998/10/9	Fresh (20%)	Cellulase R-10 (0.8%)	Mannitol (8.6%)* ¹	5°C, 48h	5%	Degraded frond products were collected, washed and incubated with the seed culture No. 1 for 2 months at 5°C.
No. 3	1998/12/21	Freeze-stocked (83%)	Cellulase R-10 (0.42%) Abalone acetone powder (0.42%)	Autoclaved seawater (16%)	5°C, 48h	0.5%	Degraded frond products were collected and incubated with the seed culture No. 2 for 7 days at 20°C. Stocked at 5°C.
No. 4	1999/4/27	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (1%)	NaCl (5%)* ²	0h	1%	Incubated with the seed culture No. 3 for 8 days at 20°C. Stocked at 5°C.
No. 5A	1999/6/29	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (1%)	NaCl (5%)* ²	0h	1%	Incubated with the seed culture No. 4 for 8 days at 20°C. Stocked at 5°C.
No. 5B	1999/6/29	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (0%)	NaCl (0%)	0h	0%	Incubated for 8 days at 20°C.
No. 5C	1999/6/29	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (1%)	NaCl (5%)* ²	0h	0%	Incubated for 8 days at 20°C.
No. 5D	1999/6/29	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (1%)	NaCl (0%)	0h	1%	Incubated with the seed culture No. 4 for 8 days at 20°C.
No. 5E	1999/6/29	Freeze-stocked (50%)	Cellulase R-10 (0%)	NaCl (5%)* ²	0h	1%	Incubated with the seed culture No. 4 for 8 days at 20°C.

*¹ 20 g fresh frond products were suspended in 80 ml of autoclaved 10.8% mannitol solution.

*² 100 g freeze-stocked frond was suspended in 100 ml of autoclaved 10% NaCl solution.

た。次にこの藻体懸濁物に、セルラーゼ（終濃度0.22% w/w, ONOZUKA R-10, ヤクルト本社）およびアワビアセトンパウダー上清液（酵素剤の使用が終濃度0.22% w/w 相当になる量を蒸留水に懸濁させた後、GF/C で吸引ろ過して得た上清を使用, Sigma) を添加し、5°C で48時間インキュベートして単細胞化処理を行なった。この分解産物約50g を3倍量のSSWで2回デカント洗浄し、280mLのSSWに懸濁したのち、500mL容のポリカーボネート製遠心ボトル(Nalgene)に収容し、スクリーキャップを閉めた状態で、2°C下で17ヶ月間放置した。試料No. 2の調製は、藻体20% w/w, セルラーゼ0.8%, マンニトール8.6% になるようSSWに懸濁し、5°C下で48h分解後、SSWで2回デカント洗浄した後、試料No. 1を発酵種（スターター）として5% v/w 添加して、5°C下で2ヶ月間培養を行なった。試料No. 3の調製は、藻体裁断物83% w/w, セルラーゼ0.42%, アワビアセトンパウダー懸濁液上清0.42%, SSW16%で懸濁し、5°C下で93h分解後、SSWで2回デカント洗浄した後、試料No. 2を0.5%添加して、20°C下で7日間培養を行なった。発酵試料No. 4とNo. 5は、酵素分解と発酵培養の過程を同時に実施した。即ちNo. 4は、藻体を等量の滅菌10% NaCl水溶液に懸濁し、裁断後、セルラーゼ1.0%と試料No. 3を1%の割合で添加し、20°C下で8日間培養を行なった。No. 5Aは、試料No. 4を1%添加してNo. 4と同様に調製した。No. 5Bは、セルラーゼ, NaCl, 試料No. 4を添加せずにNo. 5Aと同様に調製した。No. 5C, No. 5D, No. 5Eは、それぞれ試料No. 4, NaCl, セルラーゼだけを添加せずにNo. 5Aと同様に調製した。発酵が完了した試料は、次の植え継ぎに使用するまで5°C下で保存した。

微生物の計数

試料No. 4およびNo. 5 (A-E) について、培養後に微生物の計数を行なった。No. 5Bについては培養前の生菌数も測定した。微生物の計数は、直接計数法 (Porter and Feig, 1980), MPN法, 寒天平板法により行なった。直接計数法では、試料を適当な濃度に希釈後、DAPI染色し、0.2 μm径のフィルター (PCMB, Nucleopore) 上に集めて (U 励起) 蛍光顕微鏡観察により行なった。MPN法では、酵母エキス2.5g, ペプトン5.0g, NaCl25g/L (pH6.9) の組成の液体培地を使用して5本立てで行なった (清水, 1985a)。寒天平板法による計数のうち一般従属栄養微生物は、標準寒天培地 (日水製薬) にNaClを0%, 2.5%, 5%濃度で添加した培地 (SMA 0, SMA2.5, SMA 5) を使用して計数した。乳酸菌数は、BCP加プレートカウントアガール (日水製薬) にNaClを0%および5%濃度で添加した培地 (BCP 0, BCP 5) を使用し、周辺が黄色になったコロニーを乳酸菌として計数した。真菌類はサブロー培地 (日水製薬) に抗生物質混液 (各50mg/L最終濃度, ストレプトマイシン, 硫酸カナマイシン, ペニシリンGカリウム, クロラムフェニコールおよびNaClを0%および5%濃度で添加した培地 (SBR0⁺, SBR5⁺) を使用して計数した。好塩性従属栄養微生物は、マリンアガー 2216 (MA, Difco) を使用して計数した。生菌数測定のためのMPN培地, 寒天平板の培養は、20°Cで行なった。NaClの添加濃度を変えて測定した場合には、最も高い計数値を採用して記載した。酵母のタイプ別計数値は、SBR5⁺ 平板に形成されたコロニーを形体的特徴から分類した後計数し、そのコロニーの細胞を適宜顕微鏡観察により確認して記載した。

分離微生物の簡易性状試験と16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づいたタイピングと同定

a) 細菌分離株の分析

試料 No. 4 および No. 5 (A, D-E) については、計数に使用した BCP 0 プレートから 20 コロニーずつ無作為に選んで菌を分離した。試料 No. 5B については、培養前の試料を計数した MA 平板上のコロニーから 20 コロニー、培養後の試料を計数した SMA 平板上のコロニーから 20 コロニーを分離した。分離菌株については、グラム染色、細胞の形態、運動性、菌体色素、O/F 試験、オキシダーゼ、カタラーゼ、寒天分解能、ゼラチン分解能、増殖速度、ガスの産生を調べ、清水のスキームにより簡易同定した (清水, 1985b; 河合ら, 1988; Sneath *et al.*, 1989)。16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列は、まず市販キット (Gen とるくん, タカラ) により分離菌株のトータル DNA を抽出した後、ユニバーサルプライマーセット 27F (5'-dAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), および 1492R (5'-dTACGGTTACCTTGTTACGA CTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991) を使用して PCR 法により 16S rDNA 断片を増幅した。PCR 反応は、反応液 100 μ L あたり、10xPCR buffer; 10 μ L, dNTP Mix; 各 200 μ M, Primer; 各 1 μ M, Taq DNA polymerase; 2.5U, 鋳型 DNA; 50ng の組成で実施した。反応条件は、94°C で 1 分保持した後、94°C 60 秒, 60°C 45 秒, 72°C 90 秒のプログラムを 30 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分保持するプログラムで行なった。得られた約 1.5kb の増幅産物の確認は、臭化エチジウム入り 1.5% アガロースゲル電気泳動により行なった。16S rDNA の部分塩基配列 (*E. coli* 塩基配列の 41-338 番目相当) の決定は、27F プライマーを使用して Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer) を使用してダイレクトシーケンシングにより行なった。得られた塩基配列をもとに分離菌株をタイプ分けした後、タイプごとに統合データベース DDBJ/EMBL/GenBank に対して BLAST 検索にかけ、最近縁種を特定した。さらに各試料ごとの代表分離株 (菌株番号 B4101, B5201, B5401, B5501) については、ほぼ全長域の塩基配列 (*E. coli* 塩基配列の 41-1492 番目相当) を決定し、最近縁種とのあいだの Similarity value (一致した塩基数 / 決定した塩基数) を計算した。B5201 株については、同定のためさらに細胞形態の観察、胞子の形成、運動性、発酵形式、生育温度、耐塩性、糖からの酸の産生、GC 含量の各試験を実施した (Sneath *et al.*, 1989; 柳田, 1996; 鈴木, 1996)。発酵形式は、MRS 培地中を使用して 30°C 40 時間の菌体培養を行った後、乳酸産生量およびエタ

ノール産生量を市販キット (F キット D-乳酸 / L-乳酸, F キットエタノール, Roche diagnostics) により測定し、グルコースからの転換効率から判定した。生育温度、耐塩性試験 (20°C) には MRS 培地を使用した。糖からの酸の産生試験は、API50CH (bioMerieux) を使用した。

b) 酵母分離株の分析

No. 4, No. 5A, No. 5C-E の各発酵試料について、生菌数の計数に使用した SBR 5 平板上のコロニーを形態的特徴からタイピングした後、各タイプについて数株ずつ合計 10 株酵母を分離した。さらに各試料について BCP 0 平板上の酵母と思われるコロニーを 10 株ずつ無作為に分離した。次に全ての分離株について乳酸菌の場合と同じ市販キットを使用してトータル DNA を抽出し、これを鋳型としてユニバーサルプライマーセット P1 (5'-dATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') および NS8 (5'-dTCCG-CAGGTTACCTACGGA-3') (Suzuki and Nakase, 1999, Suzuki *et al.*, 1999) を使用して、乳酸菌の場合同様、PCR により 18S rRNA 遺伝子 (18S rDNA) を増幅した。PCR 反応条件は、94°C で 1 分保持した後、94°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 120 秒のプログラムを 25 サイクルおこない、最後に 72°C で 7 分保持するプログラムで行なった。NS8 プライマーを使用して、この部分塩基配列 (*Saccharomyces cerevisiae* 塩基配列の 1670-1850 番目相当) を決定した。決定された塩基配列を基に分離株をタイプ分けし、タイプごとに統合データベース DDBJ/EMBL/GenBank に対して BLAST 検索にかけ、最近縁種を特定した。さらに各タイプごとの代表株 (菌株番号 Y5201, Y5206, Y5318) については、ほぼ全長域の塩基配列を決定し、最近縁種とのあいだの Similarity value を計算した。Y5201 株および Y5206 株については、さらに以下の詳細な同定試験を実施した。形態学的性質および生理・生化学的性質試験は、Barnett *et al.* (1990), Yallow (1998) および Nakase *et al.* (1998) に従って実施した。栄養細胞および栄養 (無性) 生殖の観察は Difco Bacto Yeast morphology agar および Difco Bacto YM Broth (Becton Dickinson & Co., MD) で培養後に光学顕微鏡 (位相差および微分干渉) で観察を行った。液体培地は直径 16mm 試験管に 5 / mL を分注して用いた。子嚢胞子形成試験は、Acetate agar (McClary *et al.*, 1959) および 5 % Malt extract agar (Wickerham, 1951) を用いて 20°C, 4 ~ 20 日間の培養を行った後、光学顕微鏡を用いて無染色で観察を行った。糖類発酵試験は、Fermentation basal medium

(Wickerham, 1951) に糖基質を2% (ラフィノースのみ4%) 終濃度として加え, ダラム発酵管法により実施した。Fermentation basal mediumにはプロモチモールブルー (BTB) がpH指示薬として含まれており, 内管中のガスの発生とともにpHの低下も観察可能である。25°C, 28日間までの培養を行った。炭素化合物資化性試験はDifco Bacto Yeast Nitrogen Base (Becton Dickinson&Co.) を用い, グルコース5g当量の炭素化合物を含む10倍濃度ストック溶液を調製し, ろ過滅菌を行った。このストック溶液0.5mlを直径16mm試験管に4.5ml分注した滅菌蒸留水に加え, 供試培地とした。培養は25°C, 21日間継続した。窒素化合物資化性試験は液体培地法 (Wickerham, 1946, Wickerham, 1951) により行った。培地としてDifco Bacto Carbon Base (Becton Dickinson&Co.) を用い, 窒素源とともに10倍濃度ストック溶液を調製し, ろ過滅菌を行った。このストック溶液0.5mlを直径16mm試験管に4.5ml分注した滅菌蒸留水に加え, 供試培地とした。培養は25°C, 7日間継続した。シクロヘキシミド耐性試験はDifco Bacto Yeast Nitrogen BaseにD-glucoseを追加した液体培地に, 終濃度0.01% (w/v) となるようにCycloheximideを添加し, 25°C, 3日間培養を行った。酢酸生成試験はCuster's Chalk培地プレート (5% glucose, 0.5% calcium carbonateを含む) を用い, 25°C, 2週間までの培養を行い, 数日おきに観察を行った。ビタミンフリー生育試験はVitamin-free Yeast base (Wickerham, 1951) を用い, 25°Cで培養を行い, 3日目と7日目に観察を行った。同時に対照用として, ビタミン類 (myo-inositol, calcium pantothenate, biotin, thiamine, hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, niacin, folic acid, *p*-aminobenzoic acid, riboflavin) を添加した培地を用い比較した。生育温度試験は2% glucose-peptone-yeast extract broth および Glucose-peptone-yeast extract agar (GYP agar) を用いて行った。試験温度は37°Cおよび35°Cとした。

塩基配列のアクセッション番号と系統解析

本研究で決定された塩基配列情報は, DDBJに登録した。菌株番号 B4101, B5201, B5401, B5406, B5407, B5501, Y5201, Y5206, Y5318の塩基配列情報のアクセッション番号は, それぞれ AB070606, AB070607, AB070608, AB070609, AB070610, AB070611, AB070854, AB070855, AB070856である。系統解析に使用した菌種 *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* var. *fabri*, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, *Candida zeylanoides*,

Candida ralunensis, *Candida boleticola*, *Candida krissii*, のアクセッション番号は, それぞれ J01353, AB013567, AB013590, AB013509, AB013553, AB013532, AB013555である。決定された18S rDNA塩基配列をもとに系統樹を作成した。進化距離はKimuraの2パラメータ法 (1980) により算出し, NJ法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。進化距離はプライマー結合部位およびアライメントギャップを除いた領域を用い, Clustal W コンピュータープログラム (Thompson *et al.*, 1994) にて計算した。

海藻の発酵試験

発酵試験に使用した海藻試料はワカメおよびマコンブを除き, 横須賀沿岸で採取したものを使用した。ワカメ試料のうち一つは, 市販乾燥粉末 (若みどり, 74 μ mメッシュ通過, 理研ビタミン) を使用した。他の二つのワカメ試料は, 岩手県産の生鮮物を横浜市内のマーケットで購入した。マコンブ試料は74 μ mメッシュ通過の天日乾燥粉末を使用した。上記試料のうち生試料は, 凍結乾燥処理を行った後, ミキサ (MK, National) 単独もしくは乳鉢を使用した破碎を併用し, 1mmメッシュを通過する粉末として使用した。発酵試験は, 12mm容の滅菌試験管に海藻粉末0.5g, セルラーゼ (R-10, ヤクルト本社) 0.1gを滅菌3.5% NaCl水溶液9mLとともに加えた培地で行った。これに3種類 (菌株 B5201, Y5201, Y5206) の菌体懸濁液50 μ lずつを加え, スクリューキャップを閉じた状態で, 回転培養器 (Rotator RT-550, タイテック) にかけて, 20°C, 5rpmで7日間培養した。菌体懸濁液は, 乳酸菌 (B5201) はMRS (Merck) で, 酵母 (Y5201, Y5206) はDifco YM Broth (Becton Dickinson&Co.) で20°Cで前培養後, 滅菌0.85% NaCl水溶液でOD_{660nm}=1.0になるよう懸濁して使用した。菌体懸濁液50 μ Lに含まれる菌体数は, それぞれ2.5 $\times 10^7$ CFU (B5201), 2.7 $\times 10^4$ CFU (Y5201), 6.0 $\times 10^5$ CFU (Y5206)であった。培養後の試料は, 官能的臭気, エステル様の芳香を有するものを+, 無臭もしくは海藻本来の臭いがするものを \pm , 腐敗臭がするものを-と評価した。さらに試料を遠心処理 (10,000xg, 10min)して得た上清について市販キット (Fキット D-乳酸/L-乳酸, Fキットエタノール) によりD-/L-乳酸, およびエタノール産生量を測定した。発酵試験は二本立てで行い, 測定値は平均値で示した。

結 果

アオサ発酵試料の調製と植え継ぎ

17ヶ月経過した試料 No. 1 (Table 1) は、エステル様の芳香を有していることが観察された。この試料を光学顕微鏡で観察すると単細胞化された多数のアオサ粒子とともに桿菌、酵母、糸状菌様細胞粒子が観察され、微生物が関与する発酵らしき現象がおこっているものと推察された。試料 No. 1の一部をセルラーゼ処理した新たなアオサ試料 No. 2に移植し培養すると、芳香の発生が再現された。同様に2~4ヶ月間隔でNo. 1からNo. 4まで、芳香の発生を誘起する能力を維持したままで継代できた。試料 No. 5A は、アオサ懸濁液にNaCl, セルラーゼ, 試料 No. 4の3要素を加えて調製し、芳香が発生したことより発酵することが観察された。一方、試料 No. 5B は、上記3要素を添加せずに培養したところ、腐敗臭がおこった。試料 No. 5 (C-E) は、3要素のうち一つだけを添加せずに調製したところ、これらも同様に芳香の発生が観察され、3要素のうち2要素だけの添加でもアオサは発酵しうると考えられた。No. 1からNo. 5までの8ヶ月以上の期間、芳香の誘起の能力を維持したままでの継代が行われ、アオサ試料中には発酵スターターとして機能する微生物の存在が示唆された。

試料中の微生物相の解析

発酵試料中の微生物の計数値を Table 2に示す。最初に4回継代を行なった試料 No. 5A について直接計数法, MPN 法, 寒天平板法における生菌数の最大値を比較するとそれぞれ 6.6×10^7 cells/mL, 5.4×10^7 cells/mL, 7.1×10^7 CFU/mL とほぼ同じであり、試料 No. 5A 中の微生物の大部分は、培養法による計数が可能であると考えられた。種々の寒天平板による計数値を見ると、BCP 0 平板による値が最大

で 7.1×10^7 CFU/mL, 次いで SMA2.5 平板値が 6.0×10^7 CFU/mL であり、乳酸菌が優占していると考えられた。SBR 0 平板値は 2.8×10^7 CFU/mL であり、そのうち98%以上が酵母のコロニーであった。このことから、酵母も試料 No. 5A 中に優占しているとみなされた。試料 No. 4についても同様に乳酸菌と酵母の計数値が高く、アオサの発酵には、乳酸菌と酵母が関与していることが示唆された。一方腐敗試料である No. 5B については、培養前には海藻の藻体に付着して存在していたと推察される好塩性の細菌 (MA 平板値) が 1.0×10^5 CFU/mL のレベルで計数され、培養後も MA 平板値が 8.2×10^8 CFU/mL で寒天平板法による計数値のうちで最大を示した。また直接計数法による値の 2.0×10^9 cells/mL とは大きく開きがあることが発酵試料の場合と大きく異なっていた。試料 No. 4をスターターとして添加せずに調製した No. 5C については酵母が 1.2×10^8 CFU/mL で優占していた。またこの No. 5C 試料の MA 値が 1.2×10^8 CFU/mL と高いが、MA 平板上のコロニーを無作為に5個採取して光学顕微鏡で観察したところ、5個全てが酵母のコロニー (>80%) であることが観察された。即ち雑菌 (混入菌) の生育は、おこっていないものと考えられた。NaCl を添加せず調製した試料 No. 5D は、乳酸菌計数値が 2.3×10^8 CFU/mL と若干高めであること以外は、ほぼ No. 5A と同じ傾向の微生物相を示した。セルラーゼ無添加で調製した試料 No. 5E は、芳香の発生が弱いという傾向があったが、同じく乳酸菌と酵母が優占していた。

細菌分離株のタイピングと同定

試料 No. 4, No. 5A, No. 5D, No. 5E については、

Table 2. Microbiota in the transferred Ulva cultures

Cultures	Supplements :			Fermented/Rotten Judged from odor	Microbial counting					
	NaCl	Cellulase	Seed		D. C. (cells ml ⁻¹)	MPN (cells ml ⁻¹)	Agar plate method (CFU ml ⁻¹)			
							Heterotrophic mic ^{*1}	Lactic acid bac ^{*2}	Yeast and fungi ^{*3}	Marine mic ^{*4}
No. 4	+	+	+	Fermented	$1.1 \pm 0.2 \times 10^7$	NC	$6.7 \pm 1.1 \times 10^6$	$4.8 \pm 2.4 \times 10^6$	$3.1 \pm 0.1 \times 10^6$ (Yeast 99%)	$4.6 \pm 0.3 \times 10^6$
No. 5A	+	+	+	Fermented	$6.6 \pm 1.5 \times 10^7$	5.4×10^7	$6.0 \pm 0.1 \times 10^7$	$7.1 \pm 4.1 \times 10^7$	$2.8 \pm 1.5 \times 10^7$ (Yeast >98%)	$8.1 \pm 2.2 \times 10^6$
No. 5B	-	-	-	(Initial) Rotten	NC $2.0 \pm 0.8 \times 10^9$	NC 9.2×10^8	<10 ³ $7.2 \pm 0.4 \times 10^8$	<10 ³ $4.0 \pm 6.9 \times 10^6$	<10 ³ <10 ⁶	$1.0 \pm 0.1 \times 10^5$ $8.2 \pm 0.4 \times 10^8$
No. 5C	+	+	-	Fermented	$1.2 \pm 0.8 \times 10^8$	3.5×10^7	$1.2 \pm 0.2 \times 10^8$ (Yeast >99%)	<10 ⁶	$7.9 \pm 2.2 \times 10^7$ (Yeast >99%)	$1.2 \pm 0.1 \times 10^8$ (Yeast >80%)
No. 5D	-	+	+	Fermented	$6.7 \pm 3.9 \times 10^8$	NC	$2.6 \pm 0.3 \times 10^8$	$2.3 \pm 0.1 \times 10^8$	$2.5 \pm 0.6 \times 10^9$ (Yeast 82%)	$2.3 \pm 0.6 \times 10^9$
No. 5E	+	-	+	Weakly fermented	$1.6 \pm 0.8 \times 10^7$	NC	$8.9 \pm 0.7 \times 10^7$	$6.8 \pm 2.2 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.3 \times 10^7$ (Yeast >97%)	$1.4 \pm 0.3 \times 10^7$

Data is shown as mean \pm SE (n=3), NC: Not counted.

*1 Counted on SMA plates prepared at different (0, 2.5, 5%) NaCl concentrations. The largest colony number is shown.

*2 Counted on BCP plates prepared at different (0, 5%) NaCl concentrations. The largest colony number is shown.

*3 Counted on SBR⁺ plates prepared at different (0, 5%) NaCl concentrations. The largest colony number is shown.

*4 Counted on Marine Agar 2216.

培養後の生菌数の計数に使用したBCP 0平板から20株ずつコロニーを無作為に分離した。No. 5Bについては、BCP 0より計数値が多かったSMA2.5平板から20株を無作為に分離した。またNo. 5Bについては、培養開始時の菌相を知るため、希釈試料を各種平板培地に接種し、形成されたコロニー数の最も多かったMA平板から無作為に20株を分離した。No. 5CについてはBCP 0から分離したコロニーはすべて酵母のもので細菌株は分離されなかった。分離株について性状試験を実施した結果をTable 3に示してある。No. 4, No. 5A, No. 5Eから分離された細菌各20株は全て同一のタイプであった。即ちグラム陽性の桿菌で、運動性がなく、菌体色素を産生せず、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陰性でグルコースを発酵的に利用した。したがって清水のスキーム(門田, 多賀, 1985)による簡易同定の結果, *Lactobacillus* 属とされた。これら分離株の16S rDNAの部分塩基配列は100%一致したので, *Lactobacillus* I型と呼ぶこととした。No. 5Dから分離された20株のうち17株は, 同様に *Lactobacillus* I型であったが, 2株(B5406, B5409)および1株(B5407)はそれぞれ, 16S rDNAの部分塩基配列がI型と異なっていたので, それぞれ *Lactobacillus* II型およびIII型とした。No. 5Bの培養前試料からの分離株については, 13株が黄色-オレンジ色の菌体色素を有し, *Flavobacterium-Cytophaga* グループに分類された。残りの6株および1株は, それぞれ *Acinetobacter-Moraxella* および *Alteromonas* に分類され

た。培養後のNo. 5Bからの分離株は, 12株が *Vibrio-Aeromonas*, 4株が *Alteromonas*, 3株が *Alcaligenes-Pseudomonas*, 1株が *Streptococcus-Leuconostoc* に分類された。以上をまとめると発酵した試料においては, *Lactobacillus* I型が優占しており, NaCl, セルラーゼ, スターターの3要素を添加せず腐敗した試料においては, 多様な腐敗性の細菌種が菌相を形成していた。

Lactobacillus I型の代表株であるB5201株について詳細な性状試験を実施し, 結果をTable 4に示した。B5201株は, 胞子を形成しない非運動性の桿菌で, グルコースを基質として乳酸を炭素換算で50%の効率で産生し, 同時にエタノールと炭酸ガスを産生したことから, ヘテロ型の乳酸発酵菌と考えられた。生育温度は, 15°Cと40°Cで生育がみられ, 45°Cでは生育しなかった。生育塩分濃度は2.5%および5% NaCl濃度で生育した。糖類の資化性試験ではL-arabinose, esculin, fructose, galactose, gluconate, glucose, maltose, ribose, D-xylose, N-acetylglucosamine, 5-ketogluconateから酸を産生した。GC含量は45%(Mol)で, 決定された16S rDNAの塩基配列1475bpは, 最近縁種である *Lactobacillus brevis* (D37785)に対して99.8%の相同性を有していた。以上の結果からB5201株は *L. brevis* と同定された。B4101株, B5401株, B5501株についても16S rDNAのほぼ全長域の塩基配列が決定されたが, B5201株の配列と同一であり, 同じ *L. brevis* と考えられた。*Lactobacillus* II型であるB5406株は16S rDNAの塩基配列(1487bp)が

Table 3. Characterization and typing of bacteria isolated from Ulva-fermented cultures

Cultures	Designation of isolates	Phenotypic characteristics							Groups	Typing based on partial 16S rDNA seq.
		Gram	Cell shape	Motility	Pigment	O/F	Oxidase	Other tests		
No. 4* ¹	B4101-B4120	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> I
No. 5A* ¹	B5201-B5220	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> I
No. 5B Before incubation* ²	B5001, B5008, B5012, B5017, B5019	-	Rod	-	Orange	-	NT	Agar degradation -	<i>Flavobacterium</i> group I	NT
	B5002, B5005, B5009, B5011, B5013	-	Rod	-	Yellow	O	NT	Agar degradation -	<i>Flavobacterium</i> group I	NT
	B5006	-	Rod	-	Yellow	-	NT	Agar degradation -	<i>Flavobacterium</i> group I	NT
	B5007, B5016	-	Rod	-	Yellow	O	NT	Agar degradation +	<i>Cytophaga</i>	NT
	B5003	-	Short rod	+	Orange	-	NT	-	<i>Alteromonas</i>	NT
	B5014, B5018, B5020	-	Rod	-	-	O	NT	Growth is not slow	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT
	B5004, B5010	-	Rod	-	-	-	NT	Growth is slow	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT
	B5015	-	Short rod	-	-	-	NT	Growth is slow	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT
No. 5B After incubation* ³	B5121, B5122, B5124, B5127, B5129, B5130, B5131, B5133, B5135, B5138, B5117	-	Short rod	+	-	F	+	Gas +	<i>Vibrio-Aeromonas</i>	NT
	B5125, B5126, B5129, B5133	-	Rod	+	-	F	+	Gas +	<i>Vibrio-Aeromonas</i>	NT
	B5123, B5136, B5140	-	Rod	+	-	-	±	No rosetta, Gelatin degradation -	<i>Alcaligenes-Pseudomonas</i>	NT
	B5134	+	Coccioid	+	-	F	+	Catalase -	<i>Streptococcus-Leuconostoc</i>	NT
No. 5C* ¹	(No bacterial colony was isolated.)									
No. 5D* ¹	B5401-B5405, B5408, B5410-B5420	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> I
	B5406, B5409	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> II
	B5407	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> III
No. 5E* ¹	B5501-B5520	+	Rod	-	-	F	-	Catalase -	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> I

NT: Not tested.

*¹ 20 colonies were picked up at random from BCP0 plates.

*² 20 colonies were picked up at random from MA plates.

*³ 20 colonies were picked up at random from SMA2.5 plates.

Table 4. Further characterization of strain B5201

Characteristics	Results
Cell morphology	Rod, 1 x 1.5~2.0 μ m
Spore	—
Motility	—
Production (from glucose) of:	
Lactic acid (productivity based on carbon)	+ (50%)
Ethanol	+
Gas	+
Growth at:	
15°C	+
40°C	+
45°C	—
Growth in:	
2.5% NaCl	+
5% NaCl	+
Acid from:	
L-Arabinose, esculin, fructose, galactose, gluconate, glucose, maltose, ribose, D-xylose	+
N-Acetylglucosamine, 5-ketogluconate	±
Adonitol, amygdalin, D-arabinose, D-arabitol, L-arabitol, arbutin, cellobiose, dulcitol, erythritol, D-fucose, L-fucose, gentiobiose, gluconate, 2-ketogluconate, α -methyl-D-glucose, glycerol, glycogen, inositol, inulin, lactose, D-lyxose, mannose, α -methyl-D-mannose, melezitose, melibiose, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sorbose, starch, sucrose, D-tagatose, trehalose, D-turanose, xylitol, L-xylose, β -methyl-D-xylose	—
Mol% GC of DNA	45
16S rDNA sequence	
Closest neighbor (Acc. nos)	<i>Lactobacillus brevis</i> (D37785)
%Sequence similarity (sequence length)	99.8 (1475bp)
Suggested species	<i>Lactobacillus brevis</i>

+: Positive reaction, ±: weakly positive reaction, -: negative reaction.

Lactobacillus casei の配列と99.9%の相同性があり、*L. casei* グループの菌と考えられた。*Lactobacillus* III型である B5407株は、同配列 (1481bp) が、*Lactobacillus pentosus* の配列と100%一致し、*L. pentosus* と考えられた。

酵母分離株のタイピングと同定

酵母の生菌数を調べる際、SBR0⁺平板計数値の方が、SBR5⁺平板計数値より、若干大きい傾向があったが、SBR0⁺平板上に形成された酵母のコロニーは外見が類似していて区別がつかないのに対し、SBR5⁺平板上のコロニーは、形態的特徴が明瞭で、肉眼観察により3つのタイプに分類できた。そこで発酵した試料についてSBR5⁺平板上のコロニーを形態的特徴から分類して計数した後、合計10株を分離することとした。試料 No. 5Bからは、酵母のコロニーは分離できなかった。試料 No. 4およびNo. 5 (A, D, E) から分離された酵母は、形成されたコロニーの大きさが相対的に大きく、丸いタイプ (Type LR) とコロニーの大

きさがType LRより少し小さく、表面が滑らかなタイプ (Type MS) の2つに分かれた。Type LRのコロニーの割合は、試料 No. 4で97%、No. 5Aで84%、No. 5Dで50%、No. 5Eで90%であった。試料 No. 5Cからの分離コロニーはすべてType LRに類似していたが、そのうちの89%は少しだけ小さめであったのでType MLRとした。これらのコロニーの形態学的特徴からの分類は、18S rDNAの部分塩基配列からの分類の結果とよく符合した (Table 5)。

Type LRは、ほぼ球形の細胞を有し、サイズが(2.7-5.4) × (2.7-6.0) μ mで、多軸方向に出芽して栄養増殖し、菌体色素を産生しない。Type LRの分離株の18S rDNAの部分塩基配列は、100%一致したことから一つのタイプと考えられ、BLAST検索の結果から*Debaryomyces* I型とした。Type MLRは、Type LRと同じ形態学的特徴および細胞分裂の形式を示したが、18S rDNAの部分塩基配列が1箇所のみ異なっていたので*Debaryomyces* II型とした。Type MSは、短~長楕円形細胞を有し、サイズが(1.2-3.2) ×

Table 5. Typing and characterization of the yeast strains isolated from the Ulva-fermented cultures

Cultures	Agar plates used for isolation ^{*1}	Visual typing of colonies ^{*2} (% proportion)	No. of isolates	Results of characterization				
				Designation of isolates (Representative strain)	Cell shape ^{*3}	Budding	Pigment	Typing based on partial 18S rDNA
No. 4	SBR5 ⁺	Type LR (97)	9	Y4101-Y4109	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type MS (3)	1	Y4110	Oval	+	—	<i>Candida</i> I
	BCP0	Random isolation	10	Y4111-Y4120	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
No. 5A	SBR5 ⁺	Type LR (84)	5	Y5201-Y5205 (Y5201)	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type MS (16)	5	Y5206-Y5210 (Y5206)	Oval	+	—	<i>Candida</i> I
	BCP0	Random isolation	10	Y5211, Y5213-Y5220 Y5212	S Oval	+	—	<i>Debaryomyces</i> I <i>Candida</i> I
No. 5C	SBR5 ⁺	Type LR (11)	5	Y5301-Y5305	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type MLR (89)	5	Y5306-Y5310	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> II
	BCP0	Type WD (9)	5	Y5311-Y5315	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type W (91)	5	Y5316-Y5320 (Y5318)	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> II
No. 5D	SBR5 ⁺	Type LR (50)	6	Y5401-Y5405, Y5407	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type MS (50)	4	Y5406, Y5408-Y5410	Oval	+	—	<i>Candida</i> I
	BCP0	Random isolation	10	Y5411, Y5415-Y5417, Y5419-Y5420 Y5422-Y5424, Y5428	S Oval	+	—	<i>Debaryomyces</i> I <i>Candida</i> I
No. 5E	SBR5 ⁺	Type LR (90)	5	Y5501-Y5505	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
		Type MS (10)	5	Y5506-Y5510	Oval	+	—	<i>Candida</i> I
	BCP0	Random isolation	10	Y5511-Y5520	S	+	—	<i>Debaryomyces</i> I
				—	—	—	<i>Candida</i> I	

^{*1} SBR5⁺: 5% NaCl-Sabouraud Agar containing 50 mg /L each of streptomycin, kanamycin sulfate, penicillin G potassium, and chloramphenicol, BCP0; Plate Count Agar with BCP.

^{*2} LR; large and rough colony, MS; medium and smooth colony, MLR; medium-large and rough colony, WD; white colony with dark change after aged, W; white colony.

^{*3} S; spherical to short-oval cell, Oval; short-oval to long-oval cell.

(4.3-10.0) μ m で、多軸方向に出芽して栄養増殖し、菌体色素を産生しない。また、菌体が古くなると細胞の長さが長くなる傾向が見られた。Type MS 分離株の18S rDNA の部分塩基配列は、100%一致したことから一つのタイプと考え、BLAST 検索の結果から *Candida* I 型とした。

各発酵試料について BCP 0 平板からも10株ずつ酵母を分離して調べた。BCP 0 上の酵母のコロニーは、その周辺が黄色化せず、大きさが細菌コロニーに比べて著しく大きいので容易に細菌コロニーと区別して分離できた。試料 No. 4, No. 5 (A, D, E) の場合は、無作為に10コロニーを選択して分離した。一方、試料 No. 5C の場合は、時間が経つとコロニーの色が白から少し暗色に変化するタイプ (Type WD) と変化しないタイプ (Type W) に分類できたので区別して5株ずつ分離した。BCP0平板からの分離株も SBR5⁺ 平板からの分離株同様、*Debaryomyces* I 型、*Debaryomyces* II 型、*Candida* I 型の3タイプであった。

Debaryomyces I 型および *Candida* I 型の代表分離株、それぞれ Y5201株および Y5206株についてさらに詳細な性状試験を行なった結果を Table 6 に示す。Y5201株は、偽菌糸を形成せず、丸くて表面に凹凸のある子嚢胞子を形成することが観察された。D-glucose および sucrose に対して弱い発酵性を有す

るが D-galactose, maltose, lactose, raffinose に対しては発酵性を示さなかった。また、L-arabinose, esculin, fructose, galactose, gluconate, glucose, maltose, ribose, D-xylose を各々唯一の炭素源として増殖し、35℃での増殖能を示さなかった。18S rDNA の塩基配列 (1752bp) は、最近縁種の *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* に対して99.8%であった。以上の性状試験の結果と系統解析 (Fig. 2-2) の結果から Y5201株は *D. hansenii* var. *hansenii* と同定された。

Y5206株は、偽菌糸を形成し、子嚢胞子の形成は観察されなかった。D-glucose, sucrose, D-galactose, maltose, lactose, raffinose を基質にした発酵性は示さなかった。また、D-glucose, L-sorbose, D-glucosamine, α , α -trehalose, glycerol, D-sorbitol, D-mannitol, 2-keto-D-gluconic acid を各々唯一の炭素源として増殖し、35℃での増殖能を示さなかった。18S rDNA の塩基配列 (1750bp) は、最近縁種の *Candida zeylanoides* に対して99.5%であった。以上の性状試験の結果と系統解析 (Fig. 2) の結果から Y5206株は *C. zeylanoides* もしくはその近縁種と同定された。*Debaryomyces* II 型の代表株である Y5318株は、最近縁種 *Debaryomyces fabric* に対して99.5%、*D. hansenii* var. *hansenii* に対して99.4%であった。

Table 6. Characteristics of yeast strains Y5201 and Y5206

Characteristics	Strain Y5201	Strain Y5206
Cell shape	Spherical~slightly oval	Oval
Vegetative reproduction	Budding, multipolar	Budding, multipolar
Formation of pseudomycelium	—	+
Formation of ascospores	+, Round, warty* ¹	—* ²
Growth in YM Broth	Sediment, pellicle	NT* ³
Fermentation:		
D-Glucose, sucrose	+ weak	—
D-galactose, maltose, lactose, raffinose	—	—
Assimilation of carbon compounds:		
D-Glucose	+	+
D-Galactose	+	—
L-Sorbose	+	+
D-Glucosamine	+	+ weak
D-Ribose	—	—
D-Xylose	+	—
L-Arabinose	+	—
L-Rhamnose	+	—
Sucrose	+	—
Maltose	+	—
α, α -Trehalose	+	+
α -Methyl-D-glucoside	+	—
Cellobiose	+	—
Melibiose	—	—
Lactose	—	—
Raffinose	+	—
Melezitose	+	—
Glycerol	+	+
<i>meso</i> -Erythritol	+	—
D-Sorbitol	+	+
D-Mannitol	+	+
<i>myo</i> -Inositol	—	—
2-Keto-D-gluconic acid	+	+
D-Gluconic acid	+	—
D-Glucuronic acid	+	—
DL-Lactic acid	+	—
Assimilation of nitrogen compounds:		
Potassium nitrate	—	—
Cadaverine	+	+
Ethylamine	+	+
D-Glucosamine	—	—
L-Lysine	+	+
Growth in vitamin-free medium	—	—
Growth on 50% glucose-yeast extract agar	—	—
Growth at 35°C	—	—
at 37°C	—	NT* ³
Growth in 0.01% cycloheximide	—	—
Production of acetic acid	—	—
18S rDNA sequence		
Closest neighbor (Acc. No.)	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i> (X58053)	<i>Candida zeylanoides</i> (AB013509)
%Sequence similarity (sequence length)	99.9 (1752bp)	99.5 (1750bp)
Suggested species	<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>hansenii</i>	<i>Candida</i> sp.

*¹ Observed after 3 weeks incubation at 15°C on 5% Malt extract Agar.

*² Observed for cultures on McClary's Acetate Agar and 5% Malt extract Agar.

*³ Not tested.

18S rDNA の塩基配列に基づく系統解析の結果 (Fig. 2), Y5318株は, *Debaryomyces* 属の酵母と考えられた。

海藻発酵試験

アオサ発酵試料中の優占種として分離された3菌株 (B5201, Y5201, Y5206) を個々に前培養し, 紅藻類,

褐藻類, 緑藻類, 顕花植物を含む全22種類の海藻基質に対してセルラーゼとともに混合接種して培養したところ, 全ての海藻で, 乳酸および/もしくはエタノールの産生が観察され, 3種類の菌が発酵スターターとして機能することが確かめられた (Table 7)。産生された乳酸は0~1.14g/100mL, エタノールは0.03~

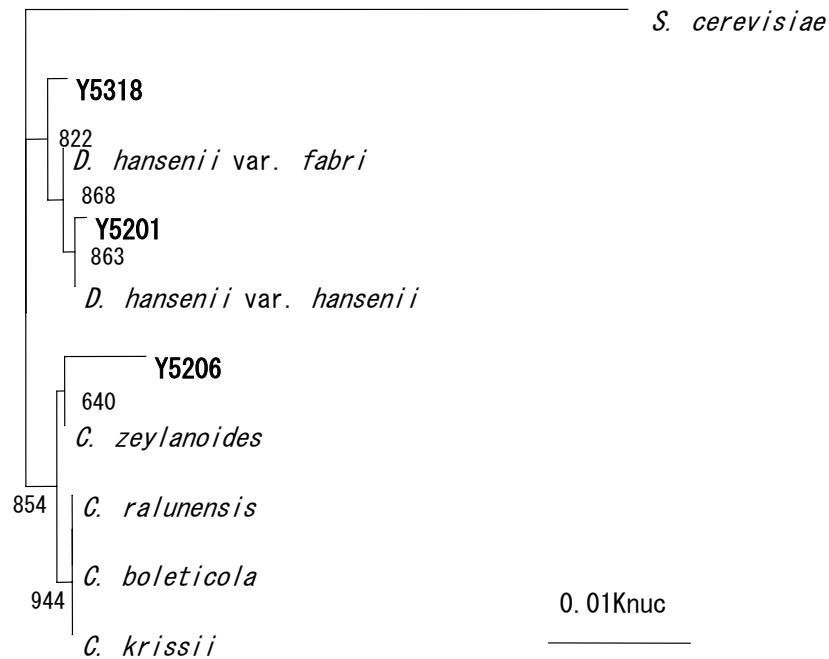


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the yeast isolates based on 18S rDNA

Table 7. Fermentation results on various kinds of seaweed with the addition of cellulase and the microbial consortium

Seaweeds*1	Group	pH		Sensory odor*2	Gas	Production (g /100mL) of:	
		Initial	After 7Ds			Lactic acid	Ethanol
<i>Chondracanthus teedii</i>	Rhodophyta	5.7	4.5	+	+	+(0.16)	+(0.18)
<i>Chondracanthus tenellus</i>		5.7	3.9	-	+	+(0.25)	+(0.18)
<i>Gelidium linoides</i>		6.5	5.3	-	+	+(0.18)	+(0.12)
<i>Gracilaria incurvata</i>		6.2	4.0	±	-	+(0.25)	+(0.12)
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>		6.0	4.0	+	+	+(0.31)	+(0.23)
<i>Hypnea charoides</i>		6.4	6.1	±	+	+(0.22)	+(0.16)
<i>Prionitis angusta</i>		6.3	3.8	-	+	+(0.25)	+(0.17)
<i>Prionitis divaricata</i>		6.4	4.7	-	+	+(0.25)	+(0.41)
<i>Pterocladia capillacea</i>		6.4	5.6	+	+	+(0.12)	+(0.08)
<i>Dilophus okamurae</i>		Phaeophyta	6.7	6.1	±	-	+(0.02)
<i>Eisenia bicyclis</i>	5.1		4.2	+	-	+(0.02)	+(0.03)
<i>Hizikia fusiformis</i>	5.4		5.0	+	+	+(0.01)	+(0.24)
<i>Ishige okamurae</i>	4.8		4.9	+	-	+(0.01)	+(0.10)
<i>Laminaria japonica</i>	5.4		3.3	+	+	+(0.16)	+(0.15)
<i>Padina arborescens</i>	6.2		5.8	+	±	-(<0.01)	+(0.08)
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	5.1		5.0	+	-	+(0.01)	+(0.04)
<i>Undaria pinnatifida</i> (Whole, commercial product)	5.7		3.6	+	+	+(0.23)	+(0.38)
<i>Undaria pinnatifida</i> (Whole)	5.8		3.9	+	+	+(0.18)	+(0.07)
<i>Undaria pinnatifida</i> (Stem)	5.9		3.5	+	+	+(0.25)	+(0.12)
<i>Ulva</i> spp. (harvested at Yokohama No. 1)	Chlorophyta	5.6	3.3	±	+	+(0.76)	+(0.16)
<i>Ulva</i> spp. (harvested at Yokohama No. 2)		5.8	4.7	±	+	+(0.45)	+(0.41)
<i>Zostera marina</i>	Vascular plant	6.0	3.3	+	-	+(1.14)	+(0.26)

*1 0.5 g of seaweed (dried) and 0.1g of cellulase R-10 were suspended with 9 mL of autoclaved 3.5% NaCl solution. 0.05 mL each of the cultured cell suspensions (OD660nm=1) of the strains B5201, Y5201 and Y5206 were added as a starter.

The culture tubes were incubated for 7 days at 20°C rotating at 5 rpm with the caps closed.

*2 +; ester-like fermented odor, ±; seaweed-originated odor, -; unacceptable rotten odor
Data is the mean of the duplicate tests.

0.41g/100mLであった。乳酸の生成量は、顕花植物、緑藻類、紅藻類、褐藻類の順に多かった。ワカメおよびマコンブは、褐藻類の中では例外的に乳酸生成量が多かった。

考 察

最初に実験室で偶然得られたアオサの発酵試料を継代した結果、発酵スターターとして安定に機能することが認められた。本研究の目的は、発酵スターターとして機能しかつ安定に継代培養できる微生物の取得であったので、アオサ試料の継代過程において、できるだけ簡便に培養維持できるよう培養条件を改変していった。具体的には、藻体の分解と糖化のために使用する酵素として当初セルラーゼとアワビアセトンパウダーとを併用して使用していたが、セルラーゼ単独で使用できることを確認し、単独使用に変更した。次に基質としてアオサの生藻体ではなく冷凍保存された藻体を使用できることを確認した。Table 1にはNo. 2～No. 4までの継代に際して継代用試料として使用した試料についてのみ培養条件を示してあるが、実際には、各継代時にデータとして示した以外の種々の培養条件を試した。この継代を行なう過程で、セルラーゼ、NaCl、スターターの3要素の添加が有効であることが経験的に感じられた。これらの3要素のうち一つだけを欠如させて継代した実験から、3要素のうち2要素だけでも芳香を伴う発酵は誘起しうることが観察された。セルラーゼについては、これを添加しないと芳香の発生が少なくなったことから、発酵の基質の生成に貢献していると考えられた。データとしては示していないが、実際、ワカメを基質にしてセルラーゼのみを添加すると、少なくともglucoseが生成してることが確認されている。NaClの添加効果は今回の実験からは明確に示されなかったが、NaClを添加せずに調製した試料は、しばしばガスが発生したり、腐敗臭が発生した。また、スターター試料を添加しなくても*Debaryomyces*型の酵母が2種類出現し、優占することを観察したことから、アオサの藻体表面に*Debaryomyces*型の酵母が、一定の頻度で存在していることが示唆された。

乳酸菌と酵母が共存系を形成しやすいことは経験的に良く知られており(伊藤, 1996)、今回分離された3種類の微生物を海藻発酵型微生物コンソーシアムと呼ぶこととした。最近Ishikawaら(2003)により、好・耐塩性、好・耐アルカリ性を特徴とする乳酸菌*Marinilactibacillus psychrotolerans*が分離され、海洋乳酸菌という言葉が提案されているが、著者らが分

離した*L. brevis*は、陸上発酵素材から頻繁に分離される種であり、海洋固有の乳酸菌種ではない。一方、分離された酵母のうち、少なくとも*D. hansenii* var. *hansenii*の方は、典型的な海産酵母として知られる(Uden *et al.*, 1968)。海藻粉末を滅菌蒸留水もしくは滅菌食塩水に懸濁させ放置しておく、特にスターターを添加しなくてもしばしば乳酸菌や酵母が出現してくることを観察することから、元々の海藻の葉体表面にはある頻度でこれらの乳酸菌や酵母が存在していると考えられ、今回分離された3種類の微生物も海藻起源であると推察された。海産酵母については、藻類の繁殖している場所に多く出現することが知られており(Fell *et al.*, 1960)、自然界では藻類が生産する糖質を主に好氣的に利用しながら生息していることが考えられる。著者の観察では、海藻を粉末状にして懸濁し、糖質が可溶化し易い状態で好氣的環境下に放置すれば、必ずしもセルラーゼを使用しなくても乳酸菌が優占してくることを経験しており、自然界でも海藻葉体が堆積したような嫌氣的条件下では、局所的に乳酸・エタノール発酵が起こっているものと予想される。

以上の結果をまとめると、アオサ発酵試料には乳酸菌*L. brevis*と酵母*D. hansenii* var. *hansenii* および*C. zeylanoides* からなる3種類の微生物が優占していることが判明し、アオサ発酵の正体が、アルコール発酵を伴う乳酸発酵であることが明らかになった。分離された3種類の菌を別々に前培養した後、その一定量をアオサ藻体に接種すると、芳香臭の発生とともに乳酸およびエタノールが産生されることが観察され、3種類の微生物が発酵スターターとして機能することが確かめられた。

第3章 海藻の単細胞化・乳酸発酵技術の検討

第1節 発酵培養条件の検討

最初に得たアオサ発酵試料を継代していく過程で、発酵を安定に再現するためにセルラーゼ、発酵スターター(微生物)、NaClの3要素を添加することが経験的に有効であった。このときセルラーゼ添加は、アオサの細胞壁成分であるセルロースを分解し、グルコース等を生成することにより、乳酸発酵のための基質を提供する役割を果たしていると考えられ、いわゆる糖化処理にあたると考えられた。実際の市販セルラーゼはセルラーゼ以外の糖質分解酵素活性を含んでおり、発酵の前段階での海藻試料の分解・糖化に関する酵素の種類が完全に理解されているわけではないが、少なくとも、セルラーゼの添加によりグルコースの生成がおこり、乳酸の生成が始まる時期とリンクしてグ

ルコースの蓄積量が低減することが確かめられている(阿部私信)。一方、NaClの添加は、非好塩性の海藻の腐敗に関与する細菌の生育を抑制するのに有効にはたらくと推察された。

一方、上記で多種類の海藻試料について、発酵基質となり得るか調べた際、ワカメにセルラーゼを添加すると乳酸発酵と並行して、非常に高い効率で藻体の単細胞化がおこることを観察した。海藻を単細胞化すれば、アルテミア等の懸濁物捕食者の餌飼料としての利用も期待できる(Uchida *et al.*, 1997a; Uchida *et al.*, 1997b)。また、ワカメは、乾燥粉末として規格の揃った試料が市販されており、入手も容易である。これらのことから、本研究では、市販乾燥ワカメ粉末を基質として、第2章で分離された3種類の微生物をスターターとして利用して効率よく単細胞化しながら乳酸発酵させることを検討した。

材料と方法

発酵試料の調製

発酵試料の調製には、500mL容のポリカーボネート製遠心ボトル(Nalgene)をオートクレーブ滅菌して使用した。ボトルにNaCl水溶液180mLを入れ、市販ワカメ粉末(若みどり、粒径 mesh No. 200通過、理研ビタミン)10.0gとセルラーゼ(R-10、ヤクルト本社)を一定量懸濁して発酵試料とした。発酵試料は、1日に1回、手振りによる混合を数回行いながらスクリュウキャップを閉めた状態で、20℃下で静置培養を行なった。最初に、スターター微生物を添加せずに、NaCl濃度、培養温度、セルラーゼ濃度を各々個別に変化させて、効率的な単細胞化のための適性条件を検討した。NaCl濃度の適否の評価は、海藻懸濁試料の凝集性、粘性、固形分の安定性から評価した。凝集性の評価は、試料調製後24時間経過してもダマが解消しない場合を++、調製直後にはダマが存在するが、24時間後には消失する場合を+、調製直後からダマがない場合を-とした。粘性は、ボトルを逆さにしたとき、試料内容物が下に移動しない場合を++、少し振ることにより数秒以内に下に移動する場合を+、直ちに下に移動する場合を-とした。浸透圧の関係でおこると考えられる海藻組織の脱水と収縮の度合いを評価するための固形分の安定性は、試料調製後6日経過した時点でボトルの底面からワカメ固形分の上面までの高さを測定し、試料液面の高さに対する比(%)で表記した。ワカメ分解産物の粒子数および粒度分布は、コールターマルチサイザーII(Coulter Electronics)で140 μ mオリフィスを使用して測定した。5.8~11.5 μ m画分

の粒子を単細胞性粒子(Single cell detritus, SCD)とみなした。海藻粒子の重量濃度分布は、粒子が球形で比重が1であるという仮定をしてコールターカウンターの粒子濃度と粒径データから計算した。次にスターターの添加効果を調べる目的で、セルラーゼ濃度を変えて調製したワカメ懸濁液に微生物混液を添加して培養を行った。微生物混液は、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* B5201株(FERM BP-7301)、酵母 *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* Y5201株(FERM BP-7302)、*Candida zeylanoides* Y5206株(FERM BP-7303)の3菌株で調製した。乳酸菌はMRS broth(Merck)、酵母はYM broth(Difco)でそれぞれ20℃で前培養した後、菌体を遠心回収し、滅菌0.85% NaCl水で2回遠心洗浄後、同液にOD_{660nm}=1.0の濃度で懸濁した。これらの懸濁液をB5201株2mL(1.0 \times 10⁹CFU)、Y5201株1mL(5.3 \times 10⁵CFU)、Y5206株1mL(1.2 \times 10⁷CFU)の分量加えて微生物混液とした。全ての試料は2本ずつ調製し、測定値は平均値で示した。

発酵試料の性状分析

従属栄養微生物の計数は、標準寒天培地(SMAと標記、日水製薬)で行った(乳酸菌、酵母の計数値を含む)。好塩性従属栄養微生物の計数は、1.5%寒天添加Marine broth 2216(MA, Difco)で行った(酵母の計数値を含むが乳酸菌の計数値は含まない)。乳酸菌の計数は、シクロヘキシミドを50mg/L濃度添加したBCP加プレートカウントアガール(BCP, 日水製薬)で行い、周辺が黄変するコロニーを乳酸菌とみなして計数した。酵母の計数は、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシン、ペニシリンGカリウム、クロラムフェニコールを各50mg/L濃度およびNaClを5%濃度で添加したサブロー寒天培地(SBR 5%, 日水製薬)で行った。酵母についてはコロニーの形態的特徴からY5201型(クリーム色、表面が凹凸状、Y5206型より大きい)とY5206型とを区別して計数し、全酵母数に対するY5201型のコロニーの割合(%)を記載した。適宜、コロニーの一部を採取し、光学顕微鏡で細胞の形態を観察することにより、コロニーの形態的特徴からの分類が正しいことを確認した。コロニーの計数は、3枚組の寒天平板で行ない、2本立ての試料の計数値の平均値で示した。

結 果

微生物を添加しない系での海藻の単細胞化条件の検討

最初に基質である乾燥ワカメの懸濁濃度を5% w/vとした。これ以上濃い濃度で調製すると、ダマ

が出来安く、また粘性が高すぎるため、試料の一部を均一に採取して性状分析することが困難と考えられた。

次に NaCl の添加濃度を検討した。溶解液の NaCl 濃度が 1% 以下の場合、乾燥ワカメ粉末は、非常に分散しにくく、試料全体の粘性が高いため、ダマを形成することが顕著であった (Table 8)。一方、溶解液の NaCl 濃度が 3.5% 以上の場合、浸透圧の影響によると思われるワカメ組織の収縮が顕著におこり、10% 濃度 NaCl 水を使用した場合、ワカメの固形分体積割合 (%) が、39% にまで減少した。このように組織の収縮による固層・液層分離は、発酵容器内での不均一な場の形成につながり、発酵を不安定にする恐れがあると考えられた。以上の物性的特徴を考慮し、NaCl 濃度は 2.5-3.5% に設定するのが好ましいと考えられた。

次に、NaCl 濃度を 3.5%、セルラーゼ濃度を 1% に固定し、培養温度を 5℃ から 50℃ の範囲で変化させて、単細胞化粒子の生成効率を比較した。経時的に試料の一部を採取し、コールターカウンターで測定したところ、徐々にワカメ粒子が単細胞化していく傾向が認められた。そこで単細胞化粒子の大きさに匹敵する 5.8~11.5 μm 画分の粒子数の増加を、異なる培養温度間で比較した。しかし、試料の粘性が高く、培養初期にはダマも存在するため、サンプリングが不正確になり易く、温度の違いによる単細胞化の効率の違いが明確に読み取れなかった (Fig. 3a)。そこで、ワカメ粒子の重量ベースの粒度分布データから 5.8~11.5 μm 画分の粒子の重量割合を計算し、温度に対してプロットして示した (Fig. 3b)。この図から培養 24 時間後では、5℃ から 20℃ までの範囲で温度に依存して単細胞化粒子の割合が高く、20℃ 以上 50℃ までの範囲では、単細胞化粒子の割合はほぼ一定である傾向を示した。また低温 (5℃) でも培養期間を長く取れば単細胞化の反応は進行し、14 日後には 5℃ から 50℃ の範囲で最終的に、単細胞化の効率はほぼ一定となり、重量換算でワ

カメ粒子の 60.1% - 69.0% が単細胞化画分で占められていた。

次にセルラーゼ濃度の影響を調べた。発酵試料は、3.5% NaCl を添加した系で調製し、20℃ で培養した。

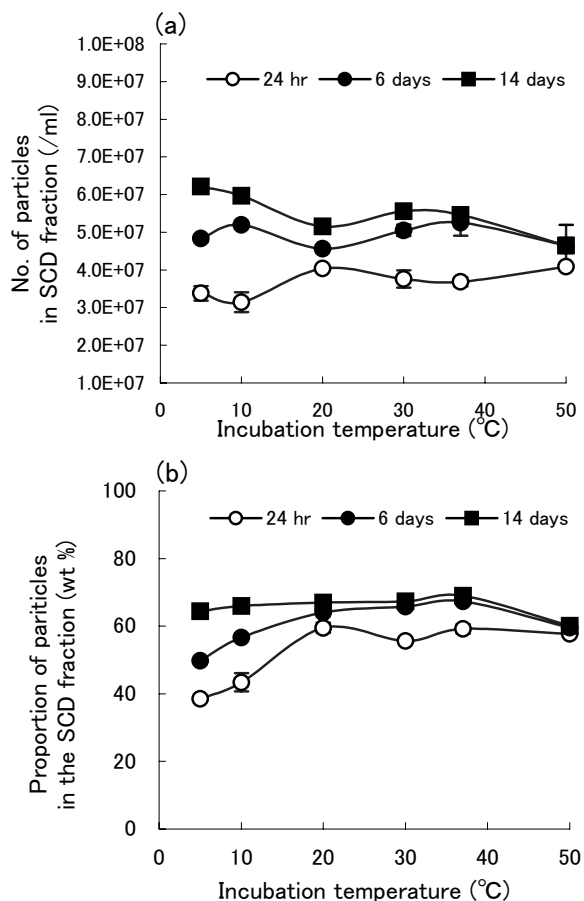


Fig. 3. Effect of culture temperature on the production efficiency of single cell detritus (SCD) from *U. pinnatifida* on the concentration of particles per milliliter (a) and %weight proportion (b) of SCD. The detrital particles in the range of 5.8-11.5 μm in diameter were tentatively regarded as SCD. Mean ± SD (n=2).

Table 8. Effect of NaCl concentration of the culture medium for the productivity of the fermented *Undaria*-SCD

Characteristics of the <i>Undaria</i> -suspension	NaCl% (w/v) of culture solution ^{*2}					
	0	1	2.5	3.5	5	10
Aggregation	++	++	+	-	-	-
Viscosity	++	++	+	-	-	-
Suspension stability (%) ^{*1}	100	98	90	71	60	39

^{*1} An index to represent the dehydration and shrinking of the frond tissues, which is expressed as the percent proportion of solid /total contents on volume basis after being left for 6 days.

^{*2} 180ml of NaCl solutions prepared at above concentrations were mixed with 10.0g *Undaria*-materials, resulting 200ml in total volume. (Final concentrations of NaCl were 0, 0.9, 2.25, 3.15, 4.5, and 9.0% w/v, respectively.)

Fig. 4a にセルラーゼ濃度と SCD 粒子の生成数との関係を示した。培養期間が3時間および24時間の短期間の場合、セルラーゼ濃度が1%までは、酵素濃度に相関して SCD 粒子の生成数が増加し、酵素濃度1%以上では、SCD 粒子の生成数は、ほぼ一定であった。培養期間が12日間と長いと酵素量が0.1~0.5%の低濃度試験区での SCD の生成数が増加し、SCD の最終生成数ではむしろ高濃度使用区を上回った。酵素使用濃度が0.25%の場合で SCD の収量が最大となり、 7.0×10^7 個/mLであった。ワカメ発酵試料は高い粘性を有するため、温度条件について検討した折、SCD の生成量を個数濃度単位で測定すると、サンプリングの困難さによる誤差が出てくることが経験されたため、SCD 画分（直径5.8~11.5 μm ）粒子の重量割合（%）を縦軸にとってセルラーゼ濃度との関係を Fig. 4b に示した。概略の傾向は、Fig. 4a と同様であり、セルラーゼ濃度1%以上の場合、培養6日目で最大の重量割合（65.4%~66.3%）を示した。セルラーゼ濃度が1%より低い場合には最大重量割合に達するまでに12日間を要したが、セルラーゼ濃度が0.1%~0.5%場合

の最大重量割合は、セルラーゼ濃度1%以上の場合の数値を若干上回り67.3%~71.1%であった。セルラーゼ濃度0%の場合、SCD 生成数および SCD 重量割合とも培養12日の間でほとんど変化がなかった。

次に酵素使用濃度が0.25%試料区の培養過程におけるワカメ粒子の粒度分布の経時変化を Fig. 5に示した。SCD 画分の重量割合は、培養12日目で全粒子中の71.1%まで上昇した。

Table 9 に、各試料の培養12日目における官能臭気および pH 値のデータを示した。官能臭気的には酵素使用量が0~0.25%の試料は、腐敗臭を発生した。酵素濃度0.5%の試料は、2本のうち1本は弱い腐敗臭を有し、他の1本は弱い芳香臭が感じられた。酵素濃度1~3%の試料は、芳香臭を発生した。pH 値は、各試料とも3.9~5.8の範囲で低下していたが、腐敗か発酵かを区別する指標には必ずしもならなかった。Table 10に各試料の微生物相を調べた結果を示した。微生物相のデータは、官能臭気による腐敗の発酵の判定結果とよく相関した。腐敗と判定された試料は、一般生菌数に対する好塩性従属栄養微生物の割合（%）が高く

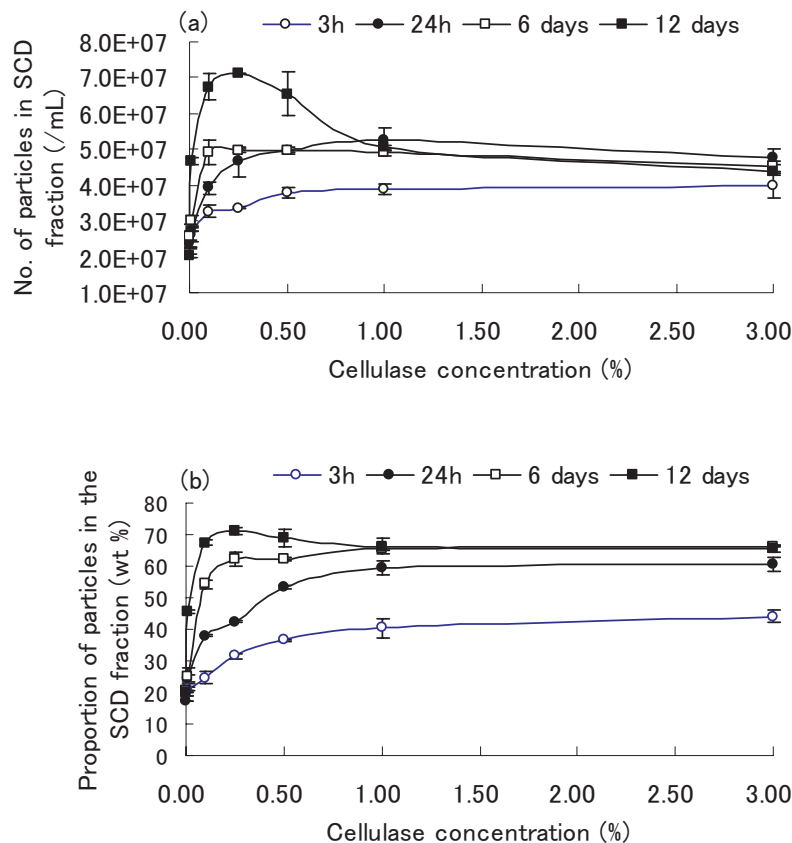


Fig. 4. Effect of cellulase concentration (w/v) on the production efficiency of SCD in the culture waters prepared in the absence of the microbial mixture. The definition of the SCD fraction is the same as for Fig. 3. The percent proportion (a) and the concentration (b) of SCD are plotted on the vertical axis, respectively. Mean \pm SD (n=2).

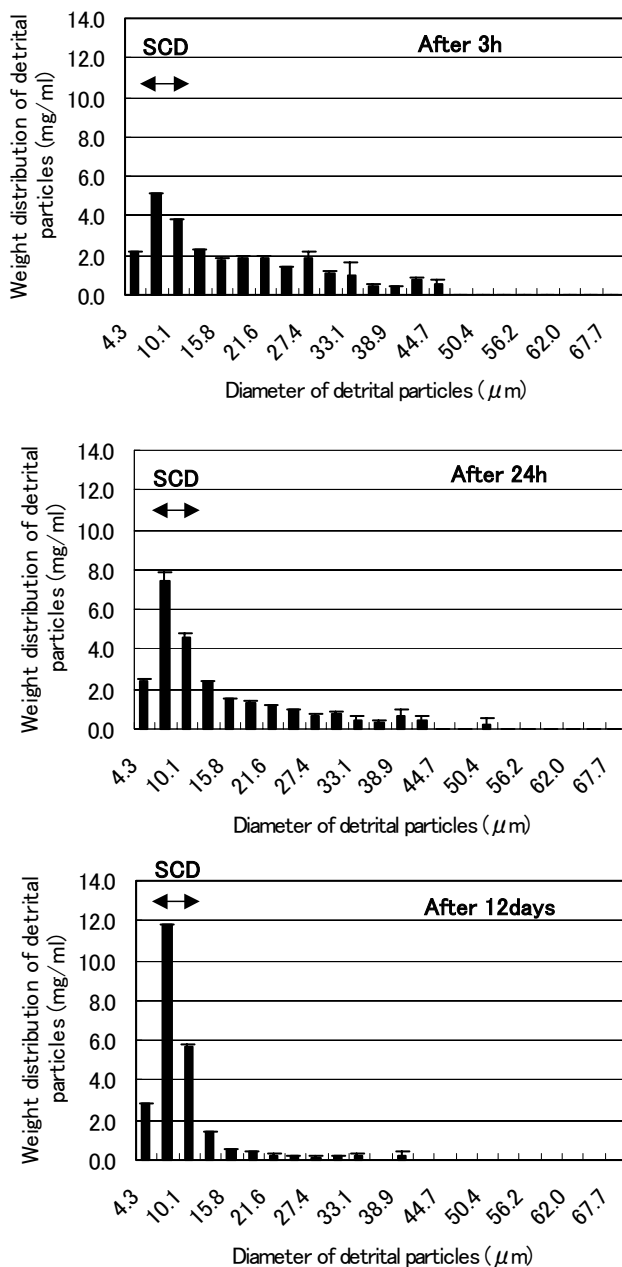


Fig. 5. Time course change in the weight distribution of *Undaria* detritus in the cultures containing cellulase at a 0.25% level. Mean \pm SD (n=2)

(64.8%~129%), 乳酸菌の割合が低い (0%~3.7%) のに対し, 発酵と判定された試料においては, 好塩性従属栄養微生物が検出されず, 乳酸菌の割合が高い (63.6%~99.4%) 傾向にあった。スターター微生物を添加しない系においては, 基質ワカメ由来と考えられる混入菌の増殖を抑制しつつワカメの単細胞化を達成するには, セルラーゼ濃度1%以上の使用が必要と考えられた。

微生物を添加した系での海藻の単細胞化条件の検討

微生物スターターを添加した系におけるセルラーゼ濃度とSCD生成数との関係をFig. 6aに, セルラーゼ濃度とSCD生成重量割合との関係をFig. 6bに示した。SCD粒子数で見ると, 最初 2.5×10^7 個/mL (重量割合18.4%) から, 培養6日目まで $3.5 \sim 5.9 \times 10^7$ 個/mL (重量割合63.0~69.1%) へと全てのセルラーゼ添加区で最大となり, その後培養12日目には, セルラーゼ高濃度区 (0.5%~3%) でむしろ減少することが観察された。SCDの最大生成数 5.9×10^7 個/mLは, セルラーゼ濃度0.5%のときに得られたが, セルラーゼ濃度0.5%でも, SCDの生成数は 5.7×10^7 個/mLと高かった。SCDの重量割合で見ると, セルラーゼ濃度1%以上では, 培養4日目には, ほぼ最大の値 (64.3%~70%) に達し12日目まで大きな変化はなかった。セルラーゼ濃度が0.25%および0.5%でも培養4日目で既にこれとほぼ同じ重量割合 (59.5%~63.8%) を達成したが, 培養12日にはさらに若干高い値 (71.2%~71.4%) を記録した。

Table 11およびTable 12に試料のその他の性状を記載してある。セルラーゼを添加しない試料は, 腐敗臭を発生し, 腐敗と判定された。一方, セルラーゼ濃度0.25%~5.0%の試料は, エステル様の芳香臭がし, 発酵状態と判定された。官能的に腐敗とされた試料では, pH値が4.8および5.0であるのに対し, 発酵とされた試料では, pH値が4.1~4.2と低い値を示した。微生物的にはセルラーゼ濃度0%の試料は, 培養5日目での微生物相が2本の試料間で大きくばらつき, 微生物学的にみて不安定な系であることを暗示した。即ち, 一つの試料は, 一般生菌数の80.5%にあたる数が

Table 9. Characteristics of the cultures prepared with different concentrations of cellulase without the addition of the microbial mixture

Characteristics of the <i>Undaria</i> -suspension*1	Cellulase % (w/v) of culture solution						
	0	0.01	0.1	0.25	0.5*2	1.0	3.0
Rotted/Fermented (judged from the odor)	Rotten	Rotten	Rotten	Rotten	Weakly rotten-fermented	Fermented	Fermented
pH value	4.9	5.3	5.7	5.8	4.5, 3.9	5.6	5.3

*1 Characteristics of the cultures after 12 days of incubation are shown.

*2 Results from the replicate bottles were different and are shown individually. For other data, means \pm SE are given.

乳酸菌であったが、もう一方の試料では、一般生菌数の92.9%が好塩性従属栄養微生物で占められていた。官能臭的に発酵状態と判定された試料では、乳酸菌が 10^8 CFU/mLを超えるレベルで優占しており、一般生菌数に対する乳酸菌数の割合が、85.5%~111%である一方、好塩性従属栄養微生物数は、3.6%~8.0%であった。試料のpH値の低下は、発酵した試料においては、乳酸の生成によりおこると考えられるが、

4.1~4.2と腐敗した試料のpH値4.8~5.0より低い傾向があった。スターターを添加した場合には、セルラーゼ濃度が0.25%で充分腐敗を抑制することができた。酵素濃度が0.5%~3.0%においては乳酸菌が $2.4\sim 2.8\times 10^8$ CFU/mL、酵母が $1.1\sim 2.2\times 10^7$ CFU/mLでY5201型酵母の全酵母に対する割合は78.1%~81.6%であった。

Table 10. Microbiota of the cultures prepared with different concentrations of cellulase without the addition of the microbial mixture

Microbial No. ^{*1} (CFU/mL)	Cellulase % (w/v) of culture solution							
	0	0.01	0.1	0.25	0.5 ^{*2}		1.0	3.0
Heterotrophic ^{*3}	$2.2\pm 1.7\times 10^7$	$4.6\pm 2.4\times 10^7$	$2.3\pm 0.9\times 10^7$	$1.8\pm 0.4\times 10^7$	3.5×10^6	1.1×10^6	$<10^5$	$2.5\pm 0.4\times 10^7$
Marine heterotrophic ^{*4} (/Heterotrophic %)	$2.4\pm 1.6\times 10^7$ (129±26)	$7.0\pm 5.1\times 10^7$ (129±43)	$1.8\pm 1.4\times 10^7$ (64.8±38.4)	$1.6\pm 0.4\times 10^7$ (109±23)	3.6×10^6 (103)	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
Lactic acid bacteria ^{*5} (/Heterotrophic %)	$<10^5$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	1.3×10^5 (3.7)	7.0×10^5 (63.6)	$<10^5$	$2.5\pm 0.5\times 10^7$ (99.4±4.2)
Yeast ^{*6}	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	1.9×10^4	4.2×10^4	$<10^2$	$<10^2$

^{*1} Characteristics of the cultures after 5 days of incubation are shown.

^{*2} Results from the replicate bottles were different and are shown individually. For other data, means ± SE are given.

^{*3} Counted on Standard Method Agar plates.

^{*4} Counted on Marine Agar 2216 plates.

^{*5} Counted only acid-producing colonies on Plate Count Agar with BCP plates containing cycloheximide at 50 mg/L.

^{*6} Counted on Sabouraud Agar plates containing NaCl at 5% and antibacterial agents (see text) each at 50 mg/L level.

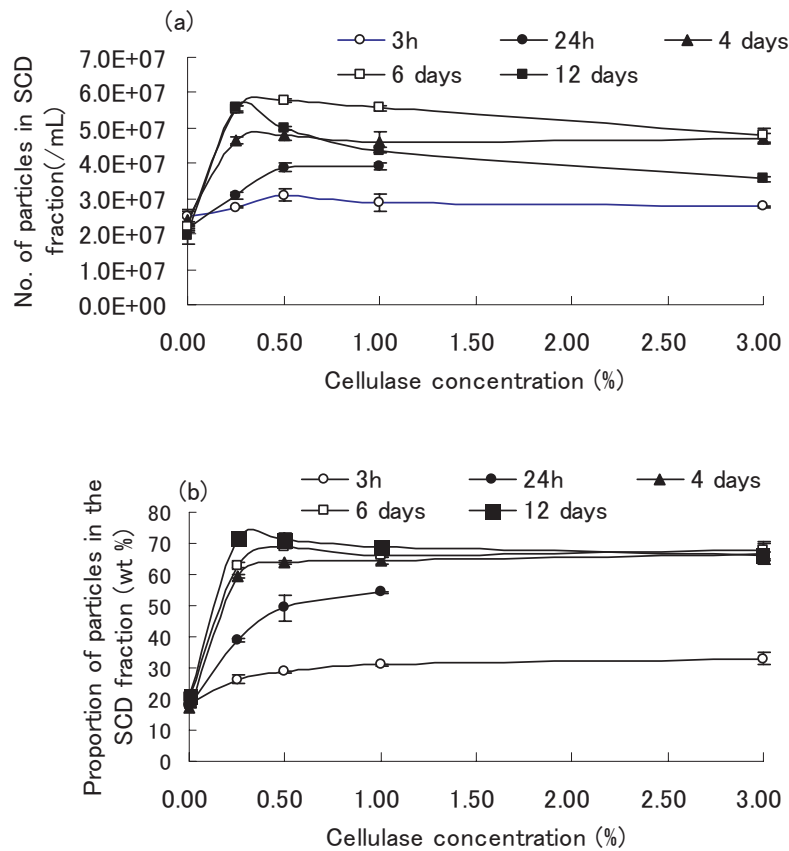


Fig. 6. Effect of cellulase concentration (w/v) on the production efficiency of SCD in the culture waters prepared in the presence of the microbial mixture. The definition of the SCD fraction is the same as for Fig. 3. The percent proportion (a) and the concentration (b) of SCD are plotted on the vertical axis, respectively. Mean ± SD (n=2).

考 察

ワカメを基質にして、単細胞化・乳酸発酵させる (Fig. 7) ための培養条件の検討を行った。検討結果をまとめると基質濃度 5 %, NaCl 濃度 2.5%~3.5%, セルラーゼ濃度 0.25% (スターター使用時)~1% (スターター不使用時), 培養温度 20℃ の条件下で安定に乳酸発酵がおり、6日~14日間の培養期間中に SCD 画分 (直径 5.8~11.5 μm) の粒子が約 5×10^7 個/mL (SCD の重量割合約 70%) の濃度で得られた。

スターターの使用は、乳酸発酵を安定に誘導するのに貢献し、セルラーゼの使用量を節約することを可能にするため、経済的に有利と考えられた。今回の実験では、スターター使用時の酵素濃度の下限は 0.25% までしか検討していないが、より低濃度の 0.1% でも発酵を達成できるか否かについては、後節で検討している。セルラーゼを 1% 濃度以上で使用した場合、培養期間が長くなるにつれ SCD 生成数が若干低下することが観察された。この傾向は、セルラーゼの使用濃度が高い程顕著であることから、SCD 粒子の生成が培養初

Table 11. Characteristics of the culture waters prepared at different concentrations of cellulase with the addition of the microbial mixture

Characteristics of the <i>Undaria</i> -suspension* ¹	Cellulase% (w/v) of culture solution				
	0* ²	0.25	0.5	1.0	3.0
Rotted/Fermented (judged from the odor)	Rotten	Fermented	Fermented	Fermented	Fermented
pH value	4.8, 5.0	4.2	4.2	4.1	4.1

*¹ Characteristics of the cultures after 12 days of incubation are shown.

*² Results from the replicate bottles were different and are shown individually. For other data, means \pm SE are given.

Table 12. Microbiota of the culture waters prepared at different concentrations of cellulase with the addition of the microbial mixture

Microbial No.* ¹ (CFU/mL)	Cellulase% (w/v) of culture solution				
	0* ²	0.25	0.5	1.0	3.0
Microbial No. (CFU/ml) counted at Day 5 on:					
Heterotrophic* ³	8.7 $\times 10^6$, 1.4 $\times 10^7$	2.9 $\pm 0.4 \times 10^8$	2.8 $\pm 0.3 \times 10^8$	2.6 $\pm 0.3 \times 10^8$	2.3 $\pm 0.1 \times 10^8$
Marine heterotrophic* ⁴ (/Heterotrophic %)	1.7 $\times 10^6$, 1.3 $\times 10^8$ (19.5), (92.9)	1.2 $\pm 0.4 \times 10^7$ (4.2 ± 0.8)	2.0 $\times 10^{7*5}$ (8.0)* ⁵	9.2 $\pm 1.9 \times 10^6$ (3.7 ± 1.1)	8.3 $\pm 1.3 \times 10^6$ (3.6 ± 0.6)
Lactic acid bacteria* ⁶ (/Heterotrophic %)	7.0 $\times 10^6$, 3.9 $\times 10^7$ (80.5), (27.9)	3.1 $\pm 0.2 \times 10^8$ (108 ± 8)	2.4 $\pm 0.3 \times 10^8$ (85.5 ± 1.5)	2.8 $\pm 0.2 \times 10^8$ (108 ± 5)	2.5 $\pm 0.6 \times 10^8$ (106 ± 19)
Yeast* ⁷ (Y5201-like/Yeast %)	2.4 $\times 10^6$, 3.5 $\times 10^6$ (15.2), (15.8)	9.8 $\pm 3.3 \times 10^6$ (53.0 ± 10.5)	1.2 $\pm 0.4 \times 10^7$ (78.1 ± 14.2)	2.2 $\pm 0.5 \times 10^7$ (81.6 ± 0.2)	1.1 $\pm 0.2 \times 10^7$ (80.7 ± 0.9)

*¹ Characteristics of the cultures after 5 days of incubation are shown.

*² Results from the replicate bottles were different and are shown individually. For other data, means \pm SE are given.

*^{3, 4, 6, 7} Counted in the same method as described in Table 10.

*⁵ Single result out of the replicate bottles is shown.

1) Decomposition to single cell detritus (SCD) by polysaccharide-degrading enzyme

2) Lactic acid fermentation with lactic acid bacteria and yeast

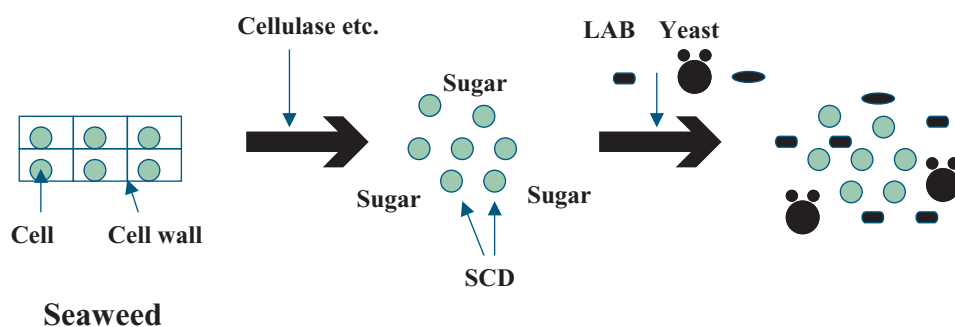


Fig. 7. Seaweed fermentation process.

期（培養24h～6日間）に急速に達成された後も、ワカメ粒子の分解・小型化がわずかつ進行するためと推察された。セルラーゼを低濃度（0.1%～0.5%）で使用した場合、培養12日目にSCD生成数が最大になり、最大値はスターター使用の如何に関わらず、セルラーゼ濃度1%以上の場合の最大値 5×10^7 個/mLをむしろ上回った。この理由は不明であるが、セルラーゼ濃度が低い場合、SCDの小型化がゆっくり進むため、粒径 $5.8 \mu\text{m}$ を少し超える位の粒子が小型化してSCDとして計数されなくなる部分の割合が少なかったという可能性が考えられる。セルラーゼ濃度が高いほど最終収率が低めになるという観察がこの考えを支持する。尚SCD粒子数が低下してもSCDの重量割合はほとんど変化しなかった（Fig. 4, Fig. 6）。

試料が発酵したか腐敗したかの判断は、官能臭気により簡便に判断できたが、今後科学的な解析を進めていくためには、客観的な指標が必要である。pH値は、発酵で生成される乳酸により4.1～4.2前後まで下がるので、ある程度の指標として使用できると考えられた（Table 11）。しかし官能的に発酵したと考えられる場合でもpHが5.3までしか下がっていない場合もあり（Table 9）、乳酸生成量も同時に測定した方が乳酸発酵の進行の度合いを評価する上でより好ましいと考えられた。データでは示していないが揮発性塩基性窒素（VBN）も値を測定して比較したが、VBNの値は、発酵・腐敗の違いにかかわらず、セルラーゼ使用量に強く相関して値が増加し、発酵・腐敗を判別するための指標にはならなかった。

一方、発酵が達成されると菌相的に乳酸菌、酵母が優占するため、微生物相から発酵・腐敗を判別できないかという視点をもって微生物相の解析を行った。

第2章において、海藻発酵試料中の微生物相の解析を行った際、発酵した試料においては、直頭法による計数値が寒天平板法による計数値とほぼ一致する傾向を認めたため、今回の微生物相の解析は、寒天平板法だけで行った。第2章と今節での寒天平板法による解析の結果から経験されたことで、今後、微生物生菌数のデータを解析する場合に有用と思われる知見を以下にまとめる：

- 1) 発酵した試料においては、乳酸菌 B5201株、酵母 Y5201株および Y5206株が優占し、混入菌の生育が抑制される。
- 2) 乳酸菌（B5201株）、酵母（Y5201株および Y5206株）とも標準寒天培地（SMA）、BCP 加プレート カウントアガール（BCP）培地上にコロニーを形成する。したがって、発酵した試料の場合、SMA 計数値と BCP 計数値は、ほぼ一致する。

3) BCP 平板上では乳酸菌は周囲が黄変する小さなコロニー、酵母は周囲が非黄変の大きなコロニーを形成するため、容易に区別して乳酸菌だけを計数することが可能である。本研究においては、SMA 計数値に対する乳酸菌計数値（BCP 上で計数した乳酸菌数）の割合（%）をもって、乳酸菌の優占度の指標とした。一方、試料が腐敗し、混入菌の生育が起こった場合には、非好塩性の従属栄養細菌の生育が起こっている場合と海藻葉体起源と考えられる好塩性の従属栄養細菌の生育が起こっている場合の二通りが可能性として考えられる。前者の場合には、上述の乳酸菌の優占度という指標により、乳酸菌の割合の低下として検出することができた。一方、後者の場合には、マリンプロス平板（MA）上での計数値が高くなるので、SMA 計数値に対する MA 計数値の割合（%）を比較することで検出することができた。ただし、その後の観察で Y5201、Y5206両株の酵母が MA 上で小さなコロニーを形成しうることが判明したため、MA 計数値から 5% NaCl 添加サブロー培地（SBR5%）計数値を差し引いた数値を真の非好塩性従属栄養細菌として比較した方が、合理的と考えられたため、後節の菌相解析からはそうすることとした。

4) 酵母 Y5201株および Y5206株はともに、MA 平板上で小さなコロニーを形成する。従って Table 12 における好塩性従属栄養微生物（Marine heterotrophic）計数値（=MA 計数値）のうちのかなりの部分は酵母の計数値に相当するものと推察される。したがって、好塩性従属栄養細菌数の真の値は、もっと少ないと考えられた。

今回、得られたワカメの単細胞化産物（SCD）は、粒径が微細藻類とほぼ同じ（ $5.8 \sim 11.5 \mu\text{m}$ ）であるため、水産初期餌料としての利用が期待できる。ワカメのSCD粒子の産生濃度は 5×10^7 個/mLであった。粒子サイズが近似している微細藻類餌料の場合と比較すると、イソクリシス（*Isocrhysis aff. galbana*）で $1 \sim 2 \times 10^7$ cells/mL（鳥羽、深山、1993）、パヴロバ（*Pavlova lutheri*）で 6×10^6 cells/mL（瀬古、1984；Tatsuzawa and Takizawa, 1995）、テトラセルミス（*Tetraselmis tetrahele*）で 3×10^6 cells/mL（岡内、1988）であり、これらの2.5～17倍に相当する。また、培養に光、エアレーション等を必要としないなど培養条件の面で有利な点が多い。特に温度管理も厳密なものを要求されない点は微細藻類餌料の場合に比べ大きな長所である。今後は大量培養の検討、保存性の確認、餌料効果の検証等をしていくことが必要と考えられる。餌飼料としての利用を考えた場合、畜産における

サイレージ飼料のように植物性の素材を乳酸発酵させて利用している例は、著者の知る限り水産飼料の分野においては無い。特に、海藻を原料としていることから粗放的な増養殖環境での利用も考えられ、著者は、今回開発した餌飼料素材をマリンサイレージと呼ぶこととした。乳酸菌、*Bacillus* 属細菌、酵母などの微生物が水産生物の生育に対して良い効果をもたらしたり (Gatesoupe, 1999; Rengpipat *et al.*, 1998; Ringo and Gatesoupe, 1998), 病原菌の抑制に対して有効に働く (Filho-lima *et al.*, 2000) との科学的知見が近年集積しつつある。本研究で開発された素材も、乳酸菌、酵母を利用して調製しており、プロバイオティクス方面での機能性の有無についても検証していく価値が充分にあると思われる。

第2節 大量調製、保存性の検証

第1節において、市販ワカメ粉末を利用して、単細胞化・乳酸発酵させることの条件検討がなされ、低コストで新たな水産飼料素材であるマリンサイレージ (MS) が大量安定生産できることが示された。今後、MSの実用化に向けては、大量生産の検討、保存性の検証をしていくことが必要と考えられた。

そこで、前節で200mL規模で行なったMSの調製を今回10L規模で実施することとした。使用するセルラーゼの使用量は、前節においてスターターを使用した場合に0.25% (w/v) まで低くしても安定に乳酸発酵が達成できることが示された。実用化に向けては、コストの面から酵素使用量をさらに低くすることが好ましい。海藻単細胞化粒子 (SCD) の生成量からいえばセルラーゼを0.1%まで少なくともSCDの最終収量には大きく影響しないことが確認されている (Fig. 4)。そこで本節では、セルラーゼ濃度を0.1%として試験を実施した。また基質ワカメの懸濁濃度は、前節での検討において分析のためのサンプリングを円滑に実施するために5%濃度 (w/v) での調製が最適としたが、本節ではやはり実用化の観点からコスト要素を重視し、懸濁可能な最大濃度である10%で実施した。また得られた発酵産物について18ヶ月間の保存試験を実施した。

材料と方法

発酵試料の調製

発酵試料の調製は、10L容のポリカーボネート製ボトル (Nalgene) をオートクレーブ滅菌して使用した。ボトルに3.3%濃度の滅菌 NaCl 水 9L を入れ、市販ワカメ粉末 (若みどり, 理研ビタミン) 1kg とセルラ

ーゼ (R-10, ヤクルト本社) 10.0g を添加し、よく混合した。これに微生物混液をスターターとして加えた。微生物混液は、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* B5201 株 (FERM BP-7301), 酵母 *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* Y5201 株 (FERM BP-7302), *Candida zeylanoides* Y5206 株 (FERM BP-7303) の3菌株で調製した。乳酸菌は MRS broth (Merck), 酵母は YM broth (Difco) でそれぞれ前培養した後、菌体を遠心回収し、滅菌0.85% NaCl 水で2回洗浄後、同液に $OD_{660nm}=1.0$ の濃度で懸濁した。これらの懸濁液を B5201株100mL (5.0×10^{10} CFU), Y5201株100mL (5.5×10^7 CFU), Y5206株10mL (1.2×10^8 CFU) を加えて微生物混液とした。発酵試料は、スクリューキャップを閉めた状態で、20°Cで静置培養した。非常に濃い基質濃度で調製したため、調製直後には一部ダマができていたため、最初の1週間は1日に数回手で振とう処理をおこない、ダマの解消を図った。

発酵試料の性状分析

ワカメ分解産物の粒子数および粒度分布は、コールトマルチサイザー II (Coulter Electronics) で140 μ m オリフィスを使用して測定した。直径5.8-11.5 μ m 画分の粒子を単細胞性粒子 (SCD) とみなして粒子数と体積割合 (%) を比較した。

従属栄養微生物の計数は、標準寒天培地 (SMA と標記, 日水製薬) で行った (乳酸菌、酵母も計数される)。好塩性従属栄養微生物の計数は、1.5%寒天添加 Marine broth 2216 (MA, Difco) で行った (酵母も計数される。乳酸菌は、通常計数されない)。乳酸菌の計数は、BCP 加プレートカウントアガール (BCP, 日水製薬) で行い、直径の大きい酵母のコロニーを除外した残りの全細菌のコロニー数を表記するとともに、そのうち周辺が黄変したコロニーを乳酸菌として乳酸菌の割合 (%) を計算した。酵母の計数は、NaCl を5%濃度で添加したサブロー寒天培地 (SBR5, 日水製薬) で行った。酵母については、前節同様、コロニーの形態的特徴から Y5201型と Y5206型とを区別して計数し、全酵母数に対する Y5201型のコロニーの割合 (%) を記載した。コロニーの計数は、3枚組の寒天平板で行ない、平均値で示した。

結 果

大量調製と保存性の検討

試料を経時的に分取して測定した性状分析の結果を Table 13に、体積粒度分布の測定結果を Fig. 8に示す。

培養開始時には乳酸が検出されず (<0.1g/L), pH

値が6.4であったが、培養4日目から8日目にかけてガスの発生とpH値の低下が観察され、乳酸菌 B5201 株によるヘテロ型の乳酸発酵が起きているものと考えられた。pH 値は6ヶ月目で4.1まで低下し安定したが、18ヶ月目には4.3とやや上昇した。乳酸生成量は、8日目で5.7g/L (D/L: 1.9/3.8) を記録し、18ヶ月で5.4g/L (D/L: 2.1/3.3) とほぼ一定で推移した。培養開始時に SCD 画分 (2.9~11.5 μm) の粒子数は 3.8×10^7 cells/mL (体積割合2.3%) であったが、培養8日目に粒子数 1.1×10^8 cells/mL (体積割合53.8%) へと増加し、培養6ヶ月目に粒子数 3.7×10^8 cells/mL (体積割合90.5%)、培養8ヶ月目に粒子数 2.6×10^8 cells/mL (体積割合93.1%)、培養18ヶ月目に粒子数 2.5×10^8 cells/mL (体積割合87.3%) とほぼ一定で推移した。

培養開始時のスターター投入前の生菌数は、一般生菌数 (SMA 計数值)、乳酸菌 (BCP 計数值)、酵母 (SBR5 計数值)、好塩性従属栄養微生物 (MA 計数值) とともに検出されないレベルであった ($<10^3 \sim <10^4$ CFU/mL)。培養8日目においては、BCP 計数值が 5.9×10^8 CFU/mL で、平板計数值の中で最大を示したが、乳酸菌のコロニーはそのうちの23.7% (1.4×10^8 CFU/mL) で、雑菌の混在が示唆された。酵母は、 3.5×10^7 CFU/mL であり、そのうち76.9%が Y5201 型、13.5%が Y5206 型であり、Y5201 型が優占していた。好塩性従属栄養微生物のみかけの計数值は、 1.3×10^8 CFU/mL であり、このうちの 3.5×10^7 CFU/mL が酵母であると仮定すると、残り 9.5×10^7 CFU/mL が好塩性従属栄養細菌の計数值と考えられた。8日目

Fig. 8. Time course change of the volume distribution of Undaria products.

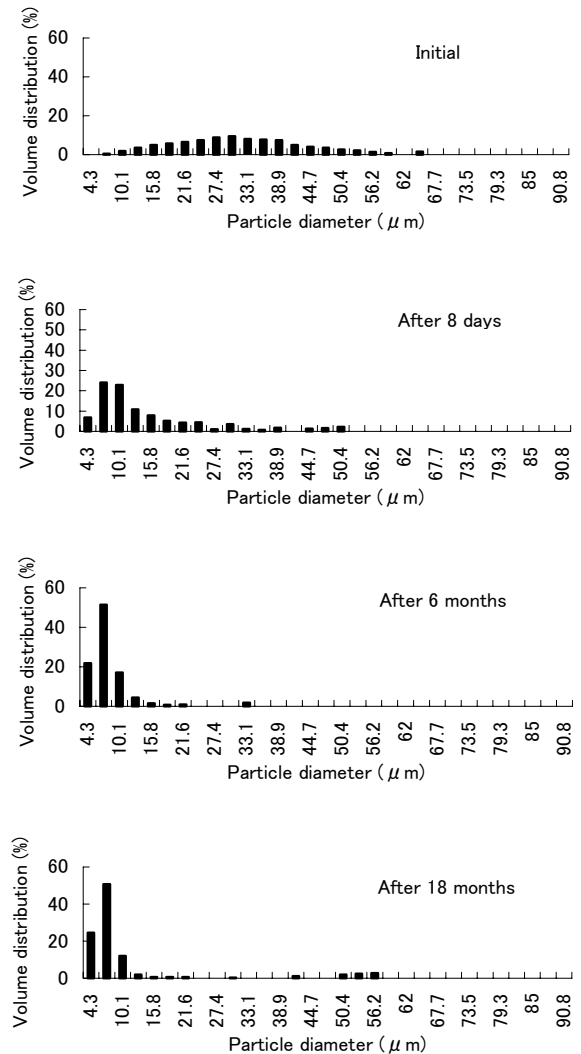


Table 13. Time course change of the characteristics of fermented Undariaproducts

Characteristics	Initial	Day 4	Day 8	Month 6	Month 8	Month 18
Gas production	—	+	+	—	—	—
pH	6.4	6	4.6	4.1	4.1	4.3
Lactic acid (D-/L-, g/L)	<0.1	NT	5.7 (1.9/3.8)	NT	NT (NT/3.6)	5.4 (2.1/3.3)
Particles in a 2.9–11.5 μm fraction						
Numbers (cells/mL)	3.8×10^7	NT	1.1×10^8	3.7×10^8	2.6×10^8	2.5×10^8
(Proportion on volume basis, %)	(2.3)	NT	(53.8)	(90.5)	(93.1)	(87.3)
Microbial counts (CFU/mL) on						
SMA*	$<10^4$	NT	1.2×10^8	NT	NT	NT
MA*	$<10^4$	NT	1.3×10^8	NT	2.5×10^5	5.5×10^5
BCP*	$<10^3$	NT	5.9×10^8	NT	2.2×10^6	7.9×10^5
(Lactic acid bacteria, %)			(23.7)		(>98.5)	(>99)
SBR5*	$<10^3$	NT	3.5×10^7	NT	1.4×10^5	4.7×10^5
(Type Y5201, %)			(76.9)		(<2.4)	(<1)
(Type Y5206, %)			(13.5)		(>97.6)	(>99)
(Other types, %)			(9.6)		(<2.4)	(<1)

* SMA; Standard Method Agar, MA; Marine Agar 2216, BCP; Plate Count Agar with BCP, and SBR5; Sabouraud Agar supplied with 5% NaCl.

NT: Not tested.

の時点でBCPの計数値が、SMAの計数値を上回ったので、8ヶ月目および18ヶ月目においては、SMAによる計数を省略した。8ヶ月目および18ヶ月目ともBCP平板上のコロニーは、全て乳酸菌のコロニーで、菌数的にはそれぞれ 2.2×10^6 CFU/mLおよび 7.9×10^5 CFU/mLと徐々に減少傾向にあった。同時期の酵母の計数値は、それぞれ 1.4×10^5 CFU/mLおよび 4.7×10^5 CFU/mLで、全てY5206型で占められていた。MA計数値からSBR5計数値を差し引いた好塩性従属栄養細菌の計算上の数値は、8ヶ月目および18ヶ月目でそれぞれ 1.1×10^5 CFU/mLおよび 8.0×10^4 CFU/mLであった。

考 察

ワカメを基質にして、単細胞化・乳酸発酵させるための培養条件の検討を10L規模でおこなった。前節での200mL規模での検討と同様、発酵は順調に達成された。前節での検討において好適とされた培養条件に比べ、基質濃度を5%から10%へ、セルラーゼ濃度を0.25%から0.1%へと変更したことにより、さらに低コスト生産が可能になった。得られたSCD画分の粒子数は最大で 3.7×10^8 cells/mL (体積割合90.5%)の濃度で得られ、保存期間中も粒子数は、横這いか微減で推移した。ほぼ粒子サイズが等しい微細藻類餌料の場合と比較すると、イソクリシス (*IsochrYSIS aff. galbana*) で $1 \sim 2 \times 10^7$ cells/mL (鳥羽, 深山, 1993), パプロバ (*Pavlova lutheri*) で 6×10^6 cells/mL (瀬古, 1984; Tatsuzawa and Takizawa, 1995), テトラセルミス (*Tetraselmis tetrahele*) で 3×10^6 cells/mL (岡内, 1988) であり、これらの18.5~123倍に相当し、微細藻類の培養に比べて遥かに高濃度で餌飼料粒子を生産できることが示された。尚、前節では、粒径 $5.6 \sim 11.5 \mu\text{m}$ 画分をSCD画分としたが、本節では18ヶ月という長期間での試験をするにあたりSCDの粒径が徐々に小型化することを考慮して、粒径 $2.9 \sim 11.5 \mu\text{m}$ 画分をSCD画分とした。これに伴い本節では乳酸菌もしくは酵母の細胞の一部がSCD粒子として計数されている可能性がある。前節においてワカメ基質濃度5%で検討した場合、SCDの最大生成濃度が $5 \sim 7 \times 10^7$ cells/mLで重量割合が67.3% (Fig. 4)であった。本節ではワカメ基質濃度10%での検討であるから、最大生成濃度はこれの2倍の $1 \sim 1.4 \times 10^8$ cells/mL、重量(体積)割合は前節と同じ67.3%程度が真の値であると推定され、これを上回る部分が微生物細胞の計数によるものである可能性がある。

微生物相の解析結果では、培養8日目の生菌数測定

において、80%前後が雑菌で占められていたと考えられるが、これは基質濃度を2倍にして、酵素濃度を下げたことの影響が出て、発酵に参与する微生物が優占化するのに少し長めの時間を要したと解釈された。しかし、徐々に乳酸菌・酵母の優占率が高まり、培養8ヶ月目および18ヶ月目の測定においては、BCP平板上のコロニーは全て乳酸菌とみなされるコロニーで占められていた。MA計数値からSBR5計数値を差し引いた好塩性従属栄養細菌の計数値は、8ヶ月目および18ヶ月目でそれぞれ 1.1×10^5 CFU/mLおよび 8.0×10^4 CFU/mLと見積もられたが、平板上のコロニーの外観が均一であったことから、1種類の微生物が優占していると考えられ、これらのコロニーを数個とって顕微鏡で観察した結果、全て酵母のコロニーであった。したがって、8ヶ月目から18ヶ月目にかけての好塩性従属栄養細菌の生菌数レベルは、検出レベル以下 ($<10^4$ CFU/mL) であったと考えられた。尚データでは示していないが、次節で開発された菌種特異的プライマーを使用した方法により、18ヶ月経過した試料から乳酸菌株を10株無作為に分離し、菌種同定したところ、10株全てが *Lactobacillus brevis* であることが確認され、菌種レベルでも微生物相的に安定に保たれていることが確認された。

以上、10L規模での高濃度での海藻発酵飼料素材(マリンサイレージ)の生産が可能であることが示された。保存性についても、20°C下で18ヶ月間の間、飼料として有効なSCD画分(直径 $2.9 \sim 11.5 \mu\text{m}$)の粒子数は、ほぼ一定に保たれ、微生物的にも混入菌の生育なく保たれることが示され、良好な保存性を有する飼料素材であると考えられた。尚、長期保存したマリンサイレージが飼料価値を有するかどうかについては、本節で調製された試料を使用し、第5章第1節において、アコヤガイ初期稚貝への飼料試験を実施する (Uchida *et al.*, 2004a)。

第4章 発酵スターターとしての使用に適した微生物の検討

第1節 PCR法を用いた菌種同定・検出技術の開発 第1項 菌種特異的プライマーを用いた同定・検出

第2章において海藻の発酵スターターとして使用できる微生物コンソーシアムが得られ、海藻の乳酸発酵技術が開発された。第3章においては、発酵試料の基質濃度、塩分濃度、培養温度等、物理化学的な面での発酵条件の検討がされた (Uchida and Murata, 2002)。海藻の乳酸発酵技術の確立に向けては、さらにスターターとして使用する微生物についての検討を

おこなうことが重要である。これまで3種類の微生物をスターターとして投入し、芳香を発生すること、乳酸菌・酵母が優占すること、乳酸が生成されpHが低下することを指標として発酵の過程を評価してきた。しかし、投入した微生物がスターターとして正常に機能しているかどうか判断するには、発酵培養後の試料において、投入した微生物が優占していることを確認すべきと考えられる。また、スターターとして使用する乳酸菌・酵母の組み合わせや種類を変えてみるなど様々な検討項目が考えられる。このような検討を加えるには、海藻発酵試料中の微生物相をできるだけ迅速かつ簡便にモニタリングする技術の開発が必要となる。微生物相を菌種もしくは株レベルで識別して検出するために近年、PCR法を用いた様々なタイピングの手法が開発されてきている。乳酸菌のタイピングを検討した例としては、16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) を標的とした菌種特異的プライマーを用いる方法 (Matsuki *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996; 渡辺ら, 1999)、16S-23S rRNA ITS 領域を標的とした菌種特異的プライマーを用いる方法 (Song *et al.*, 2000)、リボタイピング法 (Tynkkynen *et al.*, 1999)、PCR-RAPD 法 (Tynkkynen *et al.*, 1999)、パルスフィールドゲル電気泳動法 (Tankkanen *et al.*, 1990; Tynkkynen *et al.*, 1999) を使用する方法等が報告されている。本項では、スターターとして使用した乳酸菌が発酵試料中に優占しているか否か調べるために、比較的簡便で再現性の高い方法として、生菌数の計数に用いた寒天平板上のコロニーを無作為に一定の株数だけ分離し、これらの株について16S rDNA を標的とした菌種特異的プライマーを用いてタイピングする方法を検討することとした。これまで報告された16S rDNA を標的とした菌種特異的プライマーを用いる方法 (Matsuki *et al.*, 1999; Walter *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1996; 渡辺ら, 1998) では、通常2本1セットの種特異的プライマーを設計してタイピングに使用している。この方法を著者が試したところ、菌種が適合しなくてPCR産物のバンドが得られない本来の陰性の場合の外に、鋳型DNAの品質に問題があってPCR産物が得られなかったと疑われる事例をしばしば経験した。菌相解析を行う場合、多くの菌株検体をタイピングしなければならないため、PCR増幅のための鋳型DNAの抽出法は、簡便な方法を採用しなければならないが、鋳型DNAの品質が不十分になることがありうることを前提として解析手法を開発することが必要であると考えた。そこで、検体が本当に陰性の場合とPCR増幅の実行に問題があったために陰性

となった場合とを区別できる方法を考案する必要があると考えられた。このような必要性から、16S rDNAのユニバーサルプライマーセット (27F, 1492R) と1本の菌種特異的プライマーを組み合わせた Multiplex-PCR 法により、乳酸菌を菌種特異的に検出する方法を検討した。

方 法

プライマーの設計

以下の乳酸菌11種について菌種特異的プライマーの設計を検討するため、まず各菌種について DDBJ/GenBank/EMBL データベースから16S rDNA の塩基配列情報を1件ずつ収集した：*Lactobacillus brevis* (AB070607), *Lactobacillus plantarum* (AF323677), *Lactobacillus casei* (AJ272201), *Lactobacillus rhamnosus* (AF243146), *Lactobacillus zeae* (AY196979), *Lactobacillus acidophilus* (M58802), *Lactobacillus kefir* (AB024300), *Lactobacillus fermentum* (X61142), *Lactobacillus delbrueckii* (M58814), *Streptococcus thermophilus* (X68418), *Leuconostock mesenteroides* (X95978)。次に Clustal W (Thompson, 1994) を使用して、上記塩基配列を多重整列し比較した。*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. fermentum*, および *Leu. Mesenteroides* の場合は、原則として V3 領域に逆向きに菌種特異的プライマーを設計した。*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* については渡辺ら (1999) の設計したプライマーを使用した。*Str. thermophilus*, については、V3 領域に適当な特異的部位がなかったので V2 領域に設計した。これらの菌種特異的プライマーはユニバーサルプライマーセット (27F and 1492R) (Weisburg, 1991) と組み合わせて使用した。*L. casei*, *L. rhamnosus* および *L. zeae* については菌種特異的部位が見つからなかったため準特異的部位 2箇所を標的とする渡辺らの設計したプライマーを使用した。設計されたプライマーは BLAST 検索により DDBJ/GenBank/EMBL データベース内で種特異的であることを確認した。

菌 株

実験に使用した菌株 (*L. brevis* IFO 12005, *L. plantarum* YIT 0102^T, *L. plantarum* IAM 12477^T, *L. casei* IFO15883^T, *L. rhamnosus* IAM 1118^T, *L. zeae* IAM 12473^T, *L. acidophilus* IFO 13951^T, *L. kefir* YIT 0222^T, *L. fermentum* YIT 0081^T, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YIT 0181^T, *Streptococcus thermophilus* YIT 2094, *Leuconostock mesenteroides* IAM

13004^T)の入手先は以下のとおりである: 発酵研究所 (IFO, 大阪), ヤクルト本社中央研究所 (YIT, 東京), 分子細胞生化学研究所 (IAM, 東京)。*L. brevis* B5201株と *L. casei* B5406株は, 著者の研究室で分離された菌株で中央水産研究所 (FRA, 神奈川) にそれぞれ菌株番号 FRA 000033および FRA 000035として寄託されてある (内田ら, 2004)。*L. casei*として使用した IFO15883^T 株は, 16S rDNA 遺伝子配列 (*E. coli* 27-338番塩基部位) を著者の実験室で決定した結果, *L. plantarum* 型であったため, *L. casei* (*plantarum*-type) と記載した。乳酸菌株は, MRS (Merck) -1.5% 寒天平板で培養した。

PCR 反応条件

菌体 DNA の抽出は, 30 μ L の TE バッファーに少量の菌体を懸濁させ, 94 $^{\circ}$ C で15分間加熱することで行い, 加熱後の遠心 (12000rpm, 10分) 上清 1 μ L を鋳型 DNA として使用した。PCR 増幅は, MgCl₂ 2 mM, dNTP 混液 各200 μ M, 鋳型 DNA 1 μ L, プライマー各1.0 μ M, DNA ポリメラーゼ (Ex Taq, 宝酒造) 2.5U を含む100 μ l の反応液を添付バッファを用いて調製して行った。PCR の反応条件は, 94 $^{\circ}$ C で3分保持後94 $^{\circ}$ C 20秒, 55 $^{\circ}$ C 20秒, 72 $^{\circ}$ C 30秒を30サイクル行い, 最後に72 $^{\circ}$ C で5分保持した。プライマーが十分な特異性を示さない場合には, アニーリング温度を56 $^{\circ}$ C -60 $^{\circ}$ C の範囲で1-3 $^{\circ}$ C 刻みで変化させて特異性を検討した。増幅産物は, 1%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロミドで染色して観察した。

結 果

各菌種について, 菌種特異的プライマーとともに考案された検出のためのプライマーセットを Table 14 に示す。2本の (準) 特異的プライマーセット (LbC-1/LCBC-2, LbR-1/LbR-2, LbZ-1/LCBC-2) を用いて PCR 増幅を行った場合, もし鋳型 DNA が標的 DNA を含んでいた場合, 0.35kb-0.45kb サイズの1本の PCR 産物が得られた (Fig. 9, Lanes 5, 6, 7, 8)。また, 1本の特異的プライマー (B5201R1, LplanR1, LacidR1, LkfrR1, LferR1, LbD-2, STR-1, LmenR1) と1組のユニバーサルプライマーセットを用いて PCR 増幅を行った場合, もし鋳型 DNA が標的 DNA を含んでいた場合, 約0.5kb (STR-1の場合のみ0.2kb) サイズと1.5kbの2本の PCR 産物が得られた (Lanes 1, 2, 11, 14)。ただし, この場合1.5kb のバンドが, しばしば肉眼で観察されない場合も多かった (Lanes 3, 4, 9, 10, 12, 13)。1本の特異的プライマ

ーと1組のユニバーサルプライマーセットを用いる方法の場合, 標的遺伝子を含まない鋳型 DNA を対象として PCR 増幅を行った場合には, 1.5kb だけの PCR 産物が得られていることが電気泳動で確認された (データを示さず)。したがって, PCR 産物が電気泳動により1本も確認されない場合は, 鋳型 DNA の調製がうまくいってないなど別のところで問題があったと考え, 結果をやり直すかあるいは除外して解析するべきと考えられた。

次に11種14菌株を対象として, プライマーの特異性を試験した結果を Table 15 に示す。プライマー B5201R1は, アニーリング温度を58 $^{\circ}$ C にすることにより, 菌種特異的に反応した。被検菌株のうち, *L. casei* IFO 15883^T については, *L. casei* 特異的プライマーに反応せず, *L. plantarum* 特異的プライマーに反応した。しかし, 実験に使用したこの菌株の16S rDNA の部分塩基配列 (大腸菌の27-338番めの塩基部位) を決定した結果, *L. plantarum* の塩基配列と一致した。従って, プライマー LplanR1および LbC-1 は *L. plantarum* および *L. casei* に対して特異的に反応したと考えられた。LbC-1 は, *L. brevis* の1株と反応したが, 痕跡程度のバンドであるため, 判断の支障はなかった。プライマー LbR-1 は, アニーリング温度を58 $^{\circ}$ C にすることにより, *L. casei* の一部およ

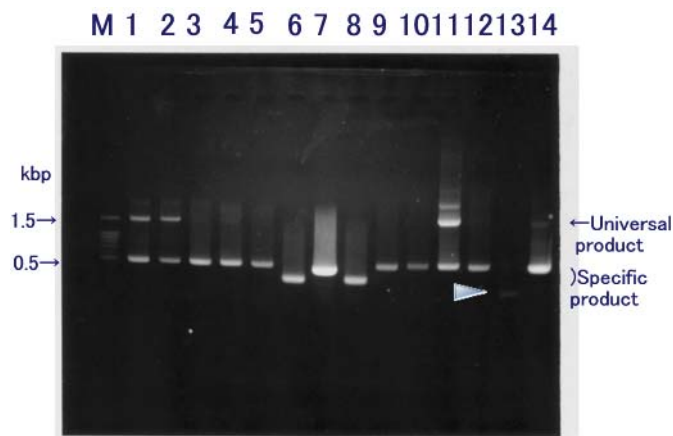


Fig. 9. PCR products for 11 species (14 strains) of lactic acid bacteria with their specific primers. Lanes: M; DNA size markers (sizes are shown to the left), 1; *L. brevis* B5201, 2; *L. brevis* IFO12005, 3; *L. plantarum* YIT 0102^T, 4; *L. plantarum* IAM 12477^T, 5; *L. casei* IFO 15883^T, 6; *L. casei* B5406, 7; *L. rhamnosus* IAM 12477^T, 8; *L. zeae* IAM 12473^T, 9; *L. acidophilus* IFO 13951^T, 10; *L. kefir* YIT 0222^T, 11; *L. fermentum* YIT 0081^T, 12; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YIT 0181^T, 13; *Str. thermophilus* YIT 2094^T, 14; *Leu. mesenteroides* IAM 13004^T. The PCR product of the lane 13 is shown with arrow to help visual observation.

Table 14. 16S rRNA-targeted specific primer sets for lactic acid bacteria

Target species	Primer	Sequence	PCR products (bp)
<i>L. brevis</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	B5201R1	5'-TGAACAGTTACTCTCAAAGG-3'	491
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>L. plantarum</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	LplanR1	5'-TGAACAGTTACTCTCAGATA-3'	491
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>L. casei</i>	LbC-1*	5'-CGAGTTCTCGTTGATGATC-3'	
	LCBC-2*	5'-AAGATTCCTACTGCTGCC-3'	327
<i>L. rhamnosus</i>	LbR-1*	5'-GCAAGTCGAACGAGTTCTGATTAT-3'	
	LbR-2*	5'-GCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCA-	446
<i>L. zeae</i>	LbZ-1*	5'-CGAGTTTTGGTCGATGAAC-3'	
	LCBC-2*	5'-AAGATTCCTACTGCTGCC-3'	327
<i>L. acidophilus</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	Lacid R1	5'-AGGCCAGTTACTACCTCTAT-3'	490
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>L. kefir</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	Lkfr R1	5'-AGATGTCAAACAGTTACTCTGAC-3'	505
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>L. fermentum</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	Lfer R1	5'-GTATGAACAGTTACTCTCAT-3'	481
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	LbD-2*	5'-AAAGACCAGTTACTGCCTCTATC-3'	489
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>Str. thermophilus</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	STR-1	5'-TAAATGACATGTGTCATCCA-5'	197
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508
<i>Leu. mesenteroides</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
	Lmen R1	5'-ATTCTAGCTGTTCTTCCCAT-3'	463
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1508

* Primers designed by Watanabe *et al.* (1998).

Table 15. Reaction of PCR amplification with 16S rRNA-targeted species-specific primer set

Tested strains	Reaction with the species-specific primer set										
	B5201R1 (+univ)	LplanR1 (+univ)	LbC-1 (+LCBC-2)	LbR-1 (+LbR-2)	LbZ-1 (+LCBC-2)	LacidR1 (+univ)	LkfrR1 (+univ)	LferR1 (+univ)	LbD-2 (+univ)	STR-1 (+univ)	LmenR1 (+univ)
<i>L. brevis</i> B5201(=FRA000033)	+(+)	-	Tr	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> IFO 12005	+(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> YIT 0102 ^T (=ATCC 12477)	Tr(-)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> IAM 12477 ^T	Tr(-)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> (<i>plantarum</i> -type)* IFO 15883 ^T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i> B5406(=FRA 000035)	-	-	+	+(Tr)	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> IAM 1118 ^T	-	-	-	+(+)	-	-	+(Tr)	-	-	-	-
<i>L. zeae</i> IAM 12473 ^T	-	-	-	+(Tr)	+	-	Tr(-)	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> IFO 13951 ^T	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>L. kefir</i> YIT 0222 ^T (=NRIC 1693)	-	-	-	-	-	-	+(Tr)	-	-	-	-
<i>L. fermentum</i> YIT 0081 ^T (=ATCC 14931)	-	-	-	-	-	-	-	+(+)	-	-	-
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT 0181 ^T (=ATCC 11842)	-	-	-	-	-	+	-	+(Tr)	+	-	-
<i>Str. thermophilus</i> YIT 2094	-	-	-	-	-	-	+(Tr)	-	-	+	-
<i>Leu. mesenteroides</i> IAM 13004 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tr	+
Hybridization temp. (°C) in PCR amplification	55(58)	55	55	55(58)	55	55	55(58)	55(58)	55	55	55

univ: an universal primer set of 27F and 1492R

+, positive; Tr, trace; -, negative

* Partial 16S rRNA gene sequence (27-338 base site of *E. coli* position) of this strain is homologous to that of *L. plantarum*.

び *L. zae* との交雑反応を少なくし、PCR 産物のバンドの太さから区別することが可能であった。プライマー LbZ-1 および LmenR1 は特異的に反応した。LacidR1 および LbD-2 は、ともに *L. acidophilus* および *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* と反応し、両者を区別することはできなかったが、その他の菌種に対しては、反応しなかった。LkfrR1 は、*L. rhamnosus* および *L. zae* と交雑反応したため、アニーリング温度を 58°C にしてみたが、十分に結果が改善されなかった。そこで LbR-1 を使用して PCR 増幅を行い、交雑検定することで *L. kefir* を特異的に検出できると考えられた。LferR1 は、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* および *Str. thermophilus* と交雑反応したが、痕跡程度であった。STR-1 は *Leu. mesenteroides* と交雑反応したが、痕跡程度であった。痕跡程度の交雑を示したものについては、交雑反応が疑われる種に対する特異的プライマーで交雑検定することで問題が解決すると考えられた。

考 察

海藻発酵試料中の乳酸菌相を種レベルで特定するため、菌種特異的プライマーを開発した。今回のプライマーを使用して以下の手順で細菌相を解析することができる。まず、標準寒天培地 (SMA) を使用して一般生菌数を計数する。次に SMA 上に形成されたコロニーを無作為に 10 個もしくは 20 個程度釣菌し、BCP 加プレートカウントアガー (BCP) に移植する。BCP 上に形成されたコロニーの周辺が黄変したものを乳酸菌とみなし、一般生菌数中に占める乳酸菌の割合 (%) を算出する。さらに、黄変したコロニーを白金耳で採り、TE バッファーに懸濁させ、菌体 DNA を加熱抽出する。この菌体溶解液の遠心上清 1 μ L を PCR 反応の鋳型 DNA として使用し、各菌種特異的プライマーを用いて検査する。以上の手順を踏むことにより、海藻発酵試料中の細菌相に関して、乳酸菌の優占度と特定の菌種の優占度を明らかにすることができる。

酵母についても同様に 18S rDNA を標的として菌種特異的プライマーを設計することを試みたが、DDBJ/GenBank/EMBL データベースから 18S rDNA の塩基配列情報を収集して検討したところ、18S rDNA の塩基配列の多様性が乏しく、種を識別するのは困難であった。近年、26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域が酵母の系統解析に有効とされ (Kurtzman and Robnett, 1998)、塩基配列情報が充実してきたため、この部分を標的としてプライマーを設計することが考えられるが、本研究においては検討せず、次節で別法

(PCR-RAPD 法) による酵母の同定・検出を検討する。

第 2 項 PCR-RAPD 法による同定・検出

第 1 項において 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) を標的とした菌種特異的プライマーを用いて、海藻発酵試料中の乳酸菌を菌種レベルで検出する方法を開発した。しかし、酵母については、18S rRNA 遺伝子を標的とした菌種特異的プライマーの設計は困難であった。また上記の方法では、菌種ごとにプライマーを用意しなければならないという欠点がある。一方、PCR-RAPD 法 (Welsh and McClelland, 1990) は、任意の合成プライマーを使用して PCR 増幅を行うことができ、また種もしくは株レベルでのより下位のタイピングに使用できる可能性がある。

本節では、市販の合成プライマーを使用して PCR-RAPD 法により、海藻発酵試料から分離される乳酸菌および酵母をタイピングすることを検討した。まず、スターターとして使用する 3 種類の微生物を識別できるかどうかを基準にプライマー候補を選択し、次に選択されたプライマーを用いて、乳酸菌および酵母の参照株を識別できるかどうか検証した。

方 法

合成プライマー

市販合成プライマー 12mer 8 種 (コモンプライマー A01~08, ベックス), 10mer 8 種 (OPA-01~08, オペロン社) および OPA-3 を改変した OPA-03-C について検討した (P1~P16, Table 16)。

菌 株

以下の菌株を被験使用した: *Lactobacillus brevis* FRA 000033 (B5201 株), *L. brevis* IAM 1082, *L. brevis* IAM 1318, *L. brevis* IFO 3960, *L. brevis* IFO 12005, *Lactobacillus plantarum* YIT 0102^T (=ATCC 12477), *L. plantarum* IAM 12477^T, *Lactobacillus casei* FRA 000035 (B5406 株), *L. casei* (*plantarum*-type), IFO 15883^T, *Lactobacillus rhamnosus* IAM1118^T, *Lactobacillus zae* IAM 12473^T, *Lactobacillus acidophilus* IFO 13951^T, *Lactobacillus kefir* YIT 0222^T (=NRIC 1693), *Lactobacillus fermentum* YIT 0081^T (=ATCC 14931), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YIT 0181^T (=ATCC 11842), *Streptococcus thermophilus* YIT 2094, and *Leuconostock mesenteroides* IAM 13004^T, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* FRA 000046 (Y5201 株), *D. hansenii* IAM 12209, *D. hansenii* IAM 12834,

Table 16. List of arbitrary synthesized primers tested for the PCR-RAPD analysis

Primer No.	Product Name	Sequence	T _m (°C)	Tested annealing Temp. (°C)
P1	Bex A01	5'-ATCAGCGCACCA-3'	42	35, 40, 45, 50
P2	Bex A02	5'-AGCAGCGCCTCA-3'	42	35, 40, 45, 50
P3	Bex A03	5'-GCCAGCTGTACG-3'	42	35, 40, 45, 50
P4	Bex A04	5'-TGCCTCGCACCA-3'	42	35, 40, 45, 50
P5	Bex A05	5'-CCGCAGTTAGAT-3'	36	35, 40, 45, 50
P6	Bex A06	5'-ACTGGCCGAGGG-3'	46	35, 40, 45, 50
P7	Bex A07	5'-GATGGATTTGGG-3'	36	35, 40, 45, 50
P8	Bex A08	5'-AGAATTGGACGA-3'	32	35, 40, 45, 50
P9	OPERON OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	34	30, 33, 35, 38
P10	OPERON OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	34	30, 33, 35, 38
P11	OPERON OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	32	30, 33, 35, 38
P12	OPERON OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	32	30, 33, 35, 38
P13	OPERON OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	32	30, 33, 35, 38
P14	OPERON OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	34	30, 33, 35, 38
P15	OPERON OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	32	30, 33, 35, 38
P16	OPERON OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	32	30, 33, 35, 38
P17	OPA-03-C	5'-AGTCAGCCA-3'	28	25, 30, 33

D. hansenii IAM 12837, *D. hansenii* IAM 12838, *Candida* sp. FRA 000047 (Y5206株), *Candida zeylanoides* IAM 12204, *Candida kruisii* JCM 1627, *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512, *S. cerevisiae* strain Yakult, *Candida sake* IFO 1213, *C. sake* IFO 1517.

菌体 DNA の調製

最初に P1～P16までのプライマーを使用して PCR 増幅の結果を比較した実験においては、3菌株 (B5201株, Y5201株, Y5206株) の菌体 DNA を市販キット (Gen とるくん, タカラ) を使用して、プロトコールに従って調製した。次にプライマーを OPA-03もしくは OPA-03-C に絞り込んで、乳酸菌および酵母の基準株を対象として検出特異性を確認する実験においては、熱水抽出法により菌体 DNA を調製した。熱水抽出法は、平板上のコロニーを、30 μ L の TE バッファーに少量の菌体を懸濁させ、94°C で15分間加熱することで行い、加熱後の遠心 (12000rpm, 5分) 上清 1 μ L を鋳型 DNA として使用した。菌体の前培養は、乳酸菌株は、MRS (Merck) -1.5% 寒天平板で、酵母は、サブロー寒天培地で行った。

PCR 反応条件

PCR 増幅は、MgCl₂ 2 mM, dNTP 混液 各200 μ M, 鋳型 DNA 1 μ L, プライマー 各1.0 μ M, DNA ポリメラーゼ (Ex Taq, 宝酒造, 東京) 2.5 U を含む100 μ L の反応液を酵素製品に添付されたバッファーを用いて調製して行った。PCR の反応条件は、94°C で3分保持後94°C 20秒, Ta°C 20秒, 72°C 30秒を30サイクル行い、最後に72°C で5分保持した。アニーリング温度

(Ta) はプライマーの T_m 値を参考に Table 14 に示した範囲で、温度を変えて PCR 増幅を行い、結果が良かったものを写真で示した。増幅産物は、1% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロミドで染色して観察した。

結 果

P1～P16までのプライマーを使用して、3菌株 (B5201, Y5201, Y5206) の菌体 DNA を鋳型にして PCR 増幅を行った結果、P1～P8および P9～P16 のプライマーともアニーリング温度を35°C に設定した場合が、増幅産物が多く、バンドも明確であったため、35°C での結果をまとめて Fig. 10 に示した。全体的に乳酸菌 B5201株の DNA を鋳型に使用した場合 (レーン a) のバンドが少ない傾向にあった。P1～P16までの結果を見て、3菌株とも複数のバンドが確認できる P11 (OPA-03) をプライマー候補として選択した。

次に、スターター 3菌株に対して、一番結果の良かったプライマー OPA-03を使用して、乳酸菌13株を対象として PCR 増幅を行い比較した (Fig. 11)。実際に海藻試料中の細菌相を分析する場合には多数の菌株検体を取り扱わなければならないと想定される。そこで、今回の検討では、簡便な熱水抽出法により調製した DNA を鋳型に使用したところ、B5201株について Fig. 10 で見られたような増幅産物のバンドが観察されなかった。また同じ *L. brevis* 株の IAM 12005株の場合も同様に増幅産物のバンドが観察されなかった。B5201株については、確認のため再度 DNA の熱水抽出を行い、同様の PCR 増幅を行ったが、結果は同じ

であった（結果を示さず）。一方、増幅産物が得られたレーン3, 4の *L. brevis* 株のバンドパターンを、Fig. 10で観察された B5201株のバンドパターンと比較すると、約2.5kb, 2.3kb, 1.6kbの3本のバンドが共通に観察され、*L. brevis* を種レベルでタイプ分けできているものと考えられた。一方、レーン5の *L. brevis* IAM 1082株の場合には、他の *L. brevis* 株にみられない約0.6kbのバンドが見られ、また2.5kbおよび2.3kbの2本のバンドの位置もレーン3, 4の株の場合と若干異なっており、菌株の違いによる差異を検出することもできる場合があることを示唆した。しかし、鋳型DNAの抽出条件が変わることにより、増幅バンドが得られないことがあるなど、結果の判定に不安定な要素があり、実用上問題があると考えられた。

熱水抽出法により調製したDNAを鋳型とすると、プライマー OPA-03を使用しても、PCR増幅産物のバンド数が充分得られない場合もあるため、このプライマーの3'末端を1塩基削ったプライマー OPA-03-Cを合成し、同様にPCR-RAPD法を試した。アニーリン

グ温度は、25℃, 30℃, 33℃で試し、最も結果の良かった30℃での結果をFig. 12に示した。プライマー OPA-03を使用した場合に比べ、バンド数が増えるなど、結果が改善されたが、依然として *L. brevis* の菌体DNAを鋳型として増幅産物のバンドを得られなかったため（レーン1, 2）、解析手法として不十分と判断された。

次にプライマー OPA-03を使用して、酵母の基準株を対象にPCRを行った結果をFig. 13に示す。鋳型DNAは、熱水抽出法により得た菌体DNAを使用した。参照株とした *D. hansenii* 株は2.3kbから1.3kbにかけて5本のバンドを形成した（レーン3~6）。一方、Y5201株の場合（レーン1）は、上記5本のバンドのうち上の2本と一番下の1本の計3本或いは上の2本と下の2本の計4本が一致しているようにも見られるが、3kb付近と4kb付近にも別のバンドが2本観察され、参照株とは明確に区別された。Y5206株は、18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析の結果からは、*Candida zeylanoides* に近縁であると

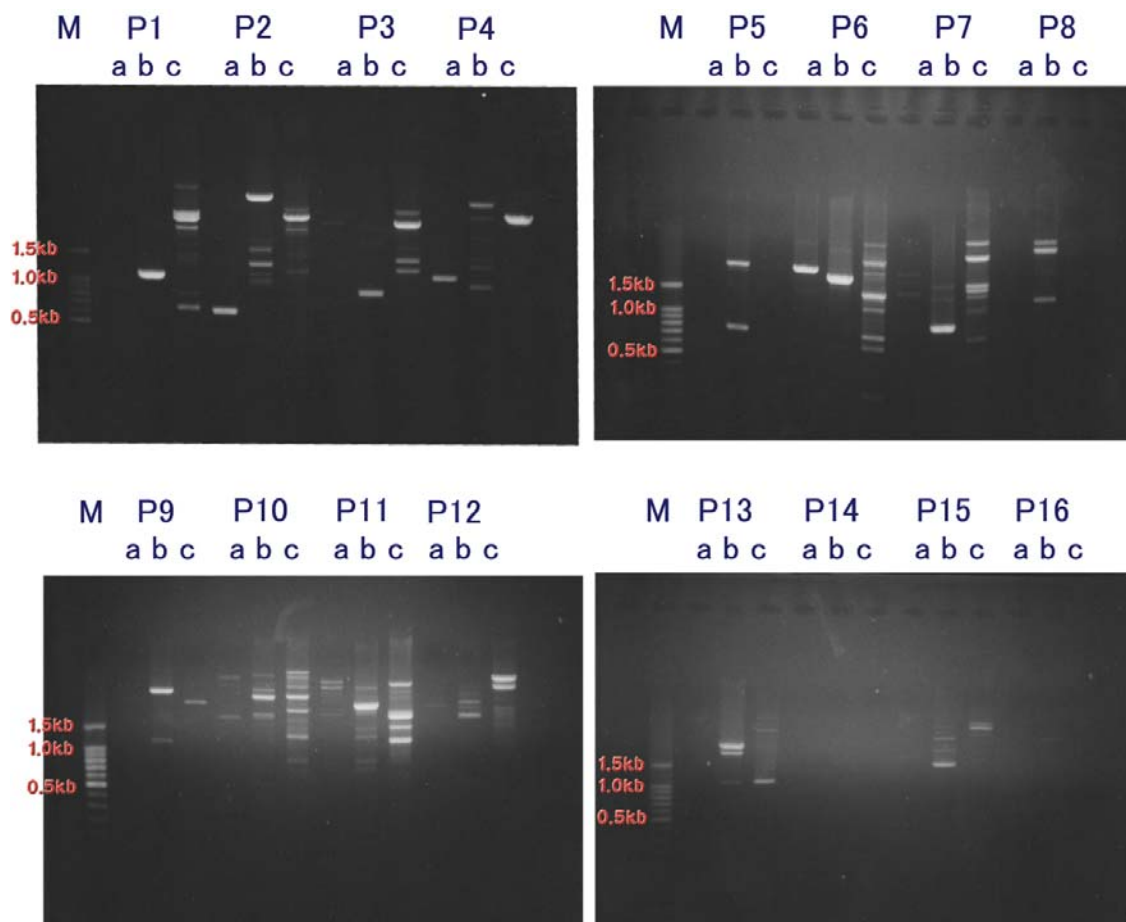


Fig. 10. PCR products obtained with primers P1 ~ P16. Total DNAs were prepared from *Lactobacillus brevis* B5201 (a), *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* Y5201 (b) and *Candida* sp. Y5206 (c) using a commercial kit (Gen toru-kun) and used as templates for the PCR amplification. Lanes M: DNA size markers.

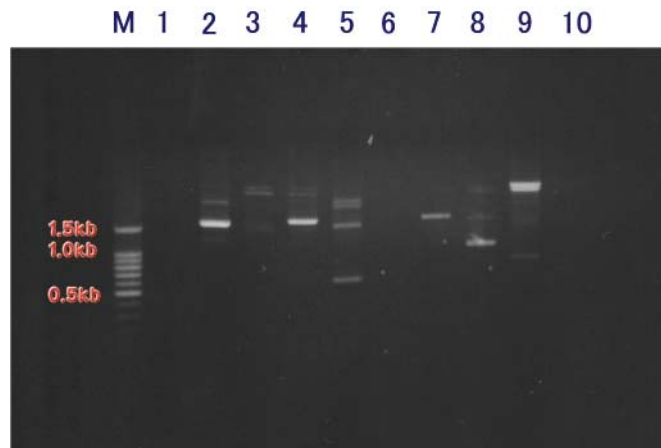


Fig. 11. PCR products for 10 species of lactic acid bacteria with a primer P11 (OPA-03). Lanes: M; DNA size markers (sizes are shown to the left), 1; *L. brevis* B5201, 2; *L. casei* B5406, 3; *L. brevis* IAM 1082, 4; *L. brevis* IAM 1318, 5; *L. brevis* IFO 3960, 6; *L. brevis* IFO 12005, 7; *L. plantarum* IAM 12477^T, 8; *L. rhamnosus* IAM 12477^T, 9; *L. zeae* IAM 12473^T, 10; *L. acidophilus* IFO 13951^T.

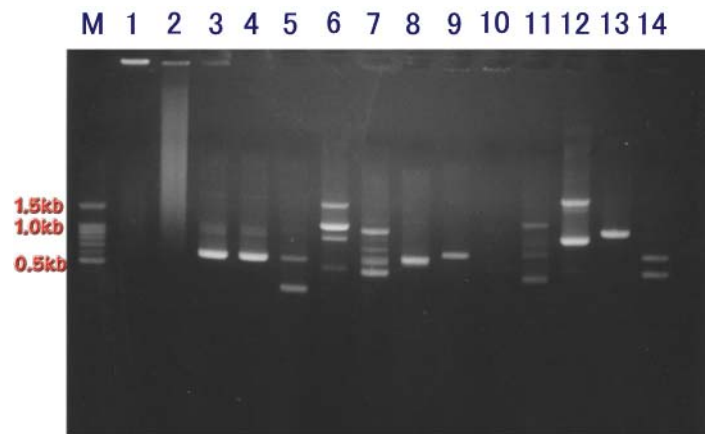


Fig. 12. PCR products for 11 species (14 strains) of lactic acid bacteria with a primer P17 (OPA-03-C). Lanes: M; DNA size markers (sizes are shown to the left), 1; *L. brevis* B5201, 2; *L. brevis* IFO 12005, 3; *L. plantarum* YIT 0102, 4; *L. plantarum* IAM 12477^T, 5; *L. casei* IFO 15883^T, 6; *L. casei* B5406, 7; *L. rhamnosus* IAM 12477^T, 8; *L. zeae* IAM 12473^T, 9; *L. acidophilus* IFO 13951^T, 10; *L. kefir* YIT 0222^T, 11; *L. fermentum* YIT 0081^T, 12; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YIT 0181^T, 13; *Str. thermophilus* YIT 2094^T, 14; *Leu. mesenteroides* IAM 13004^T.

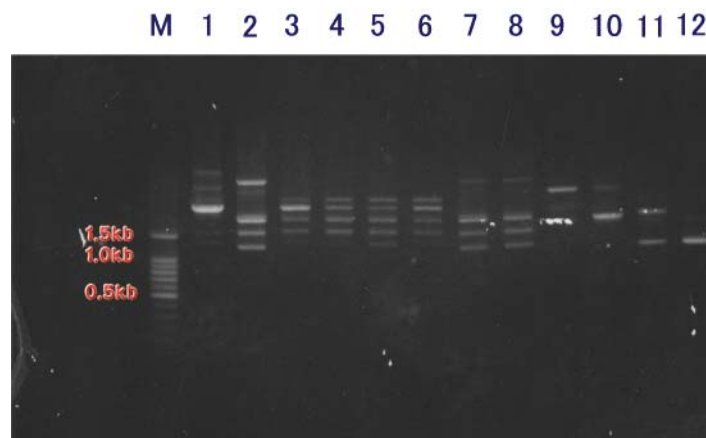


Fig. 13. PCR products for 4 species (12 strains) of yeast with a primer P11 (OPA-03). Lanes: M; DNA size markers (sizes are shown to the left), 1; Y5201, 2; Y5206, 3; *D. hansenii* IAM 12209, 4; *D. hansenii* IAM 12834, 5; *D. hansenii* IAM 12837, 6; *D. hansenii* IAM 12838, 7; *C. zeylanoides* IAM 12204, 8; *C. kruisii* JCM 1627, 9; *S. cerevisiae* IAM 4512, 10; *S. cerevisiae* strain Yakult, 11; *C. sake* IFO 1213, 12; *C. sake* IFO 1517.

ということがわかっていましたが、Sequence similarity が 99.5% (1750bp) しかなく、*Candida* sp. とされていた (第 2 章)。しかし Y5206 株の PCR-RAPD 法による増幅産物は、*C. zeylanoides* の他の参照株のパターン (レーン 7) と一致していた。PCR-RAPD 法の結果は、ゲノム全体の情報を反映するため、増幅産物パターンが *C. zeylanoides* の他の参照株と一致したことは、Y5206 株が *C. zeylanoides* であることを示唆した。18S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性が *C. zeylanoides* と極めて高い *C. kruisii* のバンドパターン (レーン 8) も *C. zeylanoides* (レーン 2, 7) のバンドパターンと全く同じであった。*S. cerevisiae* の菌株間 (レーン 9, 10) あるいは、*C. sake* の菌株間 (レーン 11, 12) で比較した場合、バンドの位置はほぼ決まっているものの、個別のバンドの濃さが異なっていることが観察され、これらの情報を合わせて判断すれば、これらの菌種については菌種レベルか場合によっては株レベルでの識別が可能と考えられた。以上の結果から、プライマー OPA-03 を使用して酵母スターター株の識別がある程度できるものと判断された。

考 察

16 種類のプライマーを使用して PCR - RAPD 法により、乳酸菌 B5201 株、酵母 Y5201 株および Y5206 株の特異的検出を試みた。市販キットを使用して粗精製した菌体 DNA を鋳型に使用した場合、OPERON 社のプライマー OPA-03 を使用して、3 菌株間の検出が可能と考えられた。次に乳酸菌、酵母の参照株を使用して同プライマーの検出特異性を調べた結果、市販キットを使用して調製した DNA を鋳型として使用した場合と異なり、熱水抽出法により調製した DNA を鋳型とした場合、乳酸菌の場合で増幅産物の泳動バンドが得られない場合があるという問題が生じることが判明した。我々が海藻発酵試料の微生物相の解析に本法を適用することを考えた場合、多数の菌株について菌種同定する必要があるため、実行可能な DNA の調製法は、熱水抽出法に限られる。したがって、今回選択したプライマー OPA-03 を使用して PCR-RAPD 法により乳酸菌を菌種レベルで検出することは困難であると考えられた。さらに OPA-03 を 1 塩基短く改変したプライマー OPA-03-C を使用することを検討したが、PCR 増幅の結果が改善され、標的とする乳酸菌種によっては有効であると考えられたが、*L. brevis* B5201 株の検出に関しては有効でなかった。一方酵母については、Y5201 株および Y5206 株を種レベルで検出するのに有効であると考えられた。特に海藻表面には、

D. hansenii タイプの酵母が、比較的高頻度で分布していることが示唆されており (第 2 章)、種レベルより下位のレベルで識別できる今回の方法は、スターターとして投入された Y5201 株を特異的に検出する目的に有効であると考えられた。

第 2 節 乳酸菌・酵母の組み合わせの検討

最初に得られたアオサの発酵試料中には乳酸菌・酵母 (B5201 株、Y5201 株、Y5206 株) からなるコンソーシアムが優占していることが判明したため、これら 3 種類を混合接種することで海藻の発酵技術を開発した (第 2, 3 章)。それでは、これら 3 種類の微生物のうちのどれかを減らしてもスターターとして機能するであろうか? また他の菌種の乳酸菌、酵母はスターターとして使用可能であろうか? これらの点を検証するため、前節において、海藻発酵試料中の微生物相を種レベルで解析する手法の検討をおこなった。その結果、乳酸菌については、菌種特異的プライマーを使用する方法、酵母については、ランダム合成プライマーを使用する PCR-RAPD 法を使用する方法が開発された。

そこで、3 種類の微生物の組み合わせをいろいろ変えて接種し、乳酸発酵の達成度および混入菌の生育の抑制の観点から、スターターとしての能力を評価した。一方、応用面から考えると、将来、海藻発酵素材は、食品素材への利用が考えられる。その場合、使用する微生物は、安全性に関する情報が乏しい野生分離株よりも、食品として安全性に実績のある菌種を使用の方が問題が少ない。そこで、食品産業で実績のある菌種で、乳酸菌、酵母の組み合わせを人工的に構成し、ワカメの発酵スターターとして機能するかどうか調べた。

方 法

スターター菌株の調製

これまでに海藻発酵試料から分離された野生型コンソーシアムとヨーグルトや漬物等の発酵食品において実績のある菌種で任意に構成した食品型コンソーシアムの 2 種類のカテゴリーのスターターを検討した。前者は、L1 : *Lactobacillus brevis* FRA 000033 (B5201 株)、Y1 : *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* FRA 000046 (Y5201 株) および Y2 : *Candida* sp. FRA 000047 (Y5206 株) により構成される。後者は、L2 : *Lactobacillus acidophilus* IAM 10074 もしくは L3 : *Lactobacillus plantarum* IAM 12477^T と Y3 : *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512 とにより構成され

るものとした。乳酸菌は MRS broth (Merck), 酵母は YM broth (Difco) でそれぞれ前培養した後, 菌体を遠心回収し, 滅菌0.85% NaCl 水で2回洗浄後, 同液に OD660nm=1.0の濃度で懸濁し, 菌体懸濁液として使用した。それぞれの菌体懸濁液は, それぞれ 8.3×10^8 CFU/mL (L1株), 1.9×10^6 CFU/mL (Y1株), 3.1×10^7 CFU/mL (Y2株), 9.9×10^8 CFU/mL (L2株), 1.6×10^9 CFU/mL (L3株), 4.0×10^6 CFU/mL (Y3株) を含有する。

海藻の発酵条件

発酵試料の調製には, 500mL 容のポリカーボネート製ボトル (Nalgene) をオートクレーブ滅菌して使用した。ボトルに3.5% NaCl 水溶液180mL を入れ, 市販ワカメ粉末 (若みどり, 理研ビタミン) 10.0g とセルラーゼ (R-10, ヤクルト本社) を0.2g 添加してよく混合した。これにスターターとして各種菌体懸濁液を2mL ずついろいろな菌体の組み合わせで添加した。発酵試料は, 1日に1回, 手振りによる混合を数回行いながらスクリュウキャップを閉めた状態で, 20℃下で14日間, 静置培養をおこなった。菌を接種しないものを対照区とした。全ての試料は2本ずつ調製した。

発酵試料の性状解析

ワカメ分解産物の粒子数および粒度分布は, コールターマルチサイザー II (Beckman Coulter, Inc.) で $140 \mu\text{m}$ オリフィスを使用して測定した。 $2.9 \sim 11.5 \mu\text{m}$ 画分の粒子を単細胞性粒子 (Single cell detritus: SCD) とみなし, 全粒度分布中における SCD 画分の体積割合 (%) を算出した。乳酸含量は, 市販キット (F kit L-乳酸, Roche Diagnostics) を使用して L-乳酸のみ測定した。

非好塩性および好塩性微生物の生菌数は, それぞれ, 標準寒天培地 (SMA, 日水製薬) および Marine Agar 2216 (MA, Difco) を使用して計数した。乳酸菌は BCP 加プレートカウントアガー (BCP, 日水製薬) を使用して, コロニー周辺が黄変したものを乳酸菌とみなして計数した。酵母は, サブロー寒天培地 (日水製薬) に NaCl を5% 添加した平板 (SBR5) で計数した。SMA 計数値に MA 計数値を加えた値から SBR 計数値を差し引いた値を総生菌数とし, 総生菌数に対する乳酸菌 (BCP 計数値), 酵母 (SBR5 計数値) および好塩性細菌 (MA 計数値-SBR5 計数値) の割合 (%) を計算して比較した。

生菌数の計数に用いた BCP 平板上に形成された黄色の乳酸菌のコロニーを無作為に10コロニーずつ分離

し, 第4章第1節で検討した菌種特異的プライマーを使用する方法により, 菌種の特異性を行った。酵母については, 同様に生菌数測定に使用した SBR5 平板上のコロニーをまず形態学的特徴より, タイプ分けし, 各タイプのコロニーを無作為に10個ずつ分離し, 同じく第4章第1節で検討した PCR-RAPD 法により菌種の特異性を行った。

統計検定

乳酸菌の接種が好塩性細菌の生育を抑制するのに有効かどうか検定するため, 好塩性細菌の生菌数の割合を, 3種類の乳酸菌を接種した群と, 乳酸菌非接種群との間で比較した。最初にデータの分散の等質性を Levene test により確認した。次に Kruskal Wallis test により, 群間の分散に有意差があるかどうか検定した。群間の分散に有意差があった場合, Games-Howell test により, 乳酸菌非接種群に対してどの試験群が有意に差があるかを検定した。酵母の接種が好塩性細菌の生育に与える影響の有無も同様に調べた。ただし, Y5201株と Y5206株を組み合わせで接種した試験群は, 排除して検討した。これらの検定は, 市販検定ソフトウェア (SPSS 11.0J, SPSS Inc.) を使用して実施した。

結 果

スターター組成の違いと発酵試料の性状

スターター組成を変えて調製した海藻発酵試料の性状分析結果を Table 17 に示した。官能臭気的には, スターター非接種の対照区試料および食品型コンソーシアムの菌種を接種した試料は腐敗臭を感じた。一方, 野生型コンソーシアムを接種した試験区のうち, 酵母 Y5201株もしくは Y5206株を接種して調製した試料は, エステル様の芳香臭を発した。酵母を接種せず乳酸菌 B5201株のみを接種した試験区 (L1) は, 芳香も腐敗臭もなく, ほのかな酸っぱい臭気がし, 乳酸が産生しているものと推察された。SCD 画分の海藻粒子の割合は, 培養前2.3%であったが, 2週間の培養後には72.8%~80.0%まで増加した。スターター非接種区では, 同画分は75.4%であった。全体的にほぼ一定の収量であり, スターター菌株の接種の有無あるいは構成の違いに関わらず良好な SCD 生成量を示した。野生型コンソーシアムを使用して調製した試料 (L1Y1Y2) では, L-乳酸が1.11g/L 産生され, pH が4.3まで低下した。乳酸菌 B5201株を単独あるいは酵母と異なる組み合わせで接種した試料でも L-乳酸が0.90-1.00g/L で産生され, pH が4.3まで低下す

Table 17. Characteristics of fermented *Undaria*-cultures prepared with different compositions of starter microorganisms

Starter compositions	Starter compositions		Characteristics of the fermented products			
	Lactic acid bacteria* ¹	yeast* ²	Odor	Volume proportion of algal particles sized in the 2.9–11.5 μm fraction (%)	L-lactic acid production (g/L)	pH
Initial	-	-	Weak seaweed odor	2.3 ± 0.0	<0.01	6.4 ± 0.0
No-starter cultures (Wild type strains)	-	-	Weak rotten odor	75.4 ± 1.8	1.42 ± 0.03	4.3 ± 0.1
L1Y1Y2	B5201	Y5201, Y5206	Ester-like odor	78.2 ± 0.0	1.11 ± 0.13	4.3 ± 0.0
L1	B5201	-	Weak sour odor	77.2 ± 0.3	0.91 ± 0.01	4.3 ± 0.0
L1Y1	B5201	Y5201	Weak ester-like odor	78.3 ± 1.4	0.90 ± 0.01	4.3 ± 0.0
L1Y2	B5201	Y5206	Ester-like odor	79.1 ± 2.9	1.00 ± 0.00	4.3 ± 0.1
Y1	-	Y5201	Weak ester-like odor	77.5 ± 1.0	0.67 ± 0.76	4.3 ± 0.0
Y2	-	Y5206	Weak ester-like odor	72.8 ± 1.4	0.51 ± 0.07	4.6 ± 0.0
Y1Y2 (Food industry-familiar species)	-	Y5201, Y5206	Weak ester-like odor	76.1 ± 0.7	0.62 ± 0.21	4.6 ± 0.3
L2	<i>L. acidophilus</i> (<i>casei</i> -type)* ³	-	Sour odor with weak rotten odor	76.4 ± 1.3	2.94 ± 0.01	3.8 ± 0.0
L3	<i>L. plantarum</i>	-	Sour odor with weak rotten odor	78.6 ± 0.6	1.92 ± 0.14	3.6 ± 0.0
L2Y3	<i>L. acidophilus</i> (<i>casei</i> -type)* ³	<i>S. cerevisiae</i>	Weak sour odor with weak rotten odor	80.0 ± 3.4	2.39 ± 0.00	3.9 ± 0.0
L3Y3	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Sour odor with weak rotten odor	78.2 ± 2.2	1.64 ± 0.04	3.7 ± 0.0
Y3	-	<i>S. cerevisiae</i>	Weak rotten odor	73.3 ± 3.1	0.44 ± 0.15	4.5 ± 0.3

The cultures were incubated for 14 days and analysed. Data is shown as means ± SD based on duplicate trials.

*¹ *L. brevis* FRA000033 (B5201), *L. acidophilus* IAM 10074, and *L. plantarum* IAM 12477 were used.

*² *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* FRA 000046(Y5201), *Candida* sp. FRA000047(Y5206) and *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512 were

*³ *L. acidophilus* IAM10074 was assigned to *L. casei* based on the results of reactions with species-specific primers.

ることが観察された。一方、酵母だけを接種した試料 (Y1, Y2, Y1Y2) では、L-乳酸産生量が低めで、0.51~0.67g/Lで、pHは4.3~4.6であった。スターター非接種の対照区試料においてもL-乳酸産生量が、1.42g/Lで、pHが4.3まで低下した。これは、ワカメ原料に由来する乳酸菌が、たまたま増殖したためと考えられた。ただし、培養開始時においては、乳酸菌は検出レベル以下 (<10³CFU/mL, Table 4-2-2)であった。食品型コンソシアムの菌種を接種した結果では、ホモ型乳酸菌である *L. acidophilus* および *L. plantarum* を接種した試験区では、より多くのL-乳酸をそれぞれ2.94g/Lおよび1.92g/Lレベルで産生し、pHもそれぞれ3.8および3.6に低下した。これらの乳酸菌に *S. cerevisiae* を併用して接種すると、L-乳酸産生量がそれぞれ2.39g/Lおよび1.64g/Lと少なめになり、pHは3.9および3.7であった。*S. cerevisiae* を単独で接種すると、L-乳酸産生量が0.44g/Lで、pHは4.5であった。

発酵試料中の微生物相

海藻発酵試料を植え継いだこれまでの経験から、海藻が順調に発酵すると、乳酸菌と酵母が優占することがわかっている。一方、試料が腐敗すると、好塩性の細菌の数が増加する傾向にある。そこで、乳酸菌、酵

母、好塩性細菌の全生菌数に対する割合を算出して比較した (Table 18)。予備試験の結果からY5201株、Y5206株を含め、酵母は、SMA, MA, SBR 5平板上にコロニーを形成することがわかっている。一方、B5201株、IAM10074株、IAM12477株を含め、乳酸菌はSMA, BCP上にコロニーを形成するが、MA上には特別な例を除いて肉眼観察できる大きさのコロニーを形成しないことがわかっている。したがって、全生菌数の数 = SMA 計数値 + MA 計数値 - SBR 5 計数値で、好塩性細菌の数 = MA 計数値 - SBR 5 計数値で、見積もることとした。自然に乳酸菌が増殖した対照区試料では、生菌数の65.7%を乳酸菌が占めていた。しかし、対照区試料では、好塩性細菌の数も多く、46.0%と試験区の中で最大であった。野生型コンソシアムを使用して調製した試料 (L1Y1Y2) では、乳酸菌が85.5%、酵母が7.6%、好塩性細菌が<0.1%であった。乳酸菌 B5201株単独接種区 (L1) では、乳酸菌が82.4%、酵母が0.2%、好塩性細菌が0.3%で、B5201株の単独接種区は、混入菌の生育抑制に有効と考えられた。B520株と異なる酵母の組み合わせで調製した試料 (L1Y1, L1Y2) では、乳酸菌が各々88.5%および94.1%、酵母がともに3.7%で好塩性細菌が各々1.4%および0.5%で非常に少なかった。それに対して酵母だけを接種した試験区 (Y1, Y2,

Y1Y2)では、好塩性細菌数が高く(11.8%~27.4%)、酵母だけの接種では、細菌相の制御は困難と考えられた。*L. acidophilus*を接種した試験区(L2, L2Y3)は、乳酸菌が優占し(各々126.6%, 96.6%)、酵母(ともに<0.1%)と好塩性細菌(各々0.7%, 9.8%)が少なく、スターターとして適していると考えられた。*L. plantarum*を接種した試験区(L3, L3Y3)は、Table 17の分析データから乳酸発酵はしたと考えられたが、好塩性細菌数が比較的大きく(各々34.5%, 19.7%)、スターターとしての適性は、B5201株に劣ると考えられた。*S. cerevisiae*単独接種区の試料は、好塩性細菌数が比較的大きく(25.0%)、混入菌の生育を抑制する能力が劣ると考えられた。*S. cerevisiae*は、SMA平板上にコロニーを形成するが、SBR5平板上にはコロニーを形成しない。したがって、Table 18の酵母計数値は、*S. cerevisiae*の生菌数を代表していないと考えられた。しかし、*S. cerevisiae*を接種した試験区において、SMA計数値(乳酸菌と酵母の計数値を含む)がBCP計数値(乳酸菌だけの計数値)と同等かもしくはこれより小さいことから、*S. cerevisiae*

の生菌数が極めて小さいことは明らかと考えられた。

乳酸菌および酵母の添加が好塩性細菌の生育を抑制する効果について、統計的に評価した(Table 19)。まず乳酸菌添加の効果を検証するため、試験区を乳酸菌非添加群、B5201株添加群、*L. acidophilus*添加群、*L. plantarum*添加群の4群に分けた。また酵母添加の効果を検証するため、試験区を酵母非添加群、Y5201株添加群、Y5206株添加群、*S. cerevisiae*添加群の4群に分けた。Levene testにより検定した結果、乳酸菌、酵母に基づく群分けとも各試験群間の好塩性細菌の生菌数のデータの等分散性が完全には保証されなかったが、これを無視してノンパラメトリックな分散分析をおこなった。まず、Kruskal Wallis testを実施した結果、乳酸菌の添加の有無による生菌数の違いは、有意(P<0.01)と判定され、酵母の添加の有無による生菌数の違いは、有意でない(P>0.05)と判定された。次にGames-Howell testにより、乳酸菌非添加群と個別に比較してどの乳酸菌試験群に有意差があるか検定した。その結果、B5201株添加群および*L. acidophilus*添加群に差があることが判明した(とも

Table 18. Study on microbial flora in the fermented *Undaria* cultures prepared with different compositions of lactic acid bacteria and yeast

Starter compositions	Viable counts (CFU/mL)					Proportion based on viable counts (%)			
	Non-halophilic mic. (Counted on SMA)	Halophilic mic. (Counted on MA)	Lactic acid bac. (Counted on BCP)	Yeast (Counted on SBR5)	Total mic. (SMA+MA-SBR5)	Lactic acid bac. BCP/Total	Yeast SBR5/Total	Halophilic contaminant bac. (MA-SBR5)/Total	
Initial	< 10 ³	< 10 ³	< 10 ³	< 10	< 10 ³				
No-starter cultures (Wild type strains)	76.4 ± 13.2 × 10 ⁶	70.9 ± 44.1 × 10 ⁶	93.2 ± 14.4 × 10 ⁶	<0.01 × 10 ⁶	147.2 ± 30.8 × 10 ⁶	65.7 ± 23.5	< 0.1	46.0 ± 20.3	
L1Y1Y2	49.0 ± 0.4 × 10 ⁶	3.0 ± 0.4 × 10 ⁶	41.3 ± 0.0 × 10 ⁶	3.7 ± 0.2 × 10 ⁶	48.3 ± 0.3 × 10 ⁶	85.5 ± 0.5	7.6 ± 0.5	< 0.1	
L1	50.9 ± 7.3 × 10 ⁶	0.3 ± 0.5 × 10 ⁶	42.4 ± 11.5 × 10 ⁶	0.1 ± 0.1 × 10 ⁶	51.0 ± 7.1 × 10 ⁶	82.4 ± 11.1	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.5	
L1Y1	43.2 ± 1.2 × 10 ⁶	2.0 ± 0.6 × 10 ⁶	38.5 ± 5.4 × 10 ⁶	1.6 ± 0.7 × 10 ⁶	43.5 ± 0.0 × 10 ⁶	88.5 ± 12.4	3.7 ± 1.6	1.4 ± 2.0	
L1Y2	46.2 ± 13.4 × 10 ⁶	2.0 ± 0.4 × 10 ⁶	43.9 ± 13.9 × 10 ⁶	1.8 ± 0.8 × 10 ⁶	46.4 ± 13.3 × 10 ⁶	94.1 ± 3.1	3.7 ± 0.6	0.5 ± 0.4	
Y1	16.2 ± 10.1 × 10 ⁶	8.4 ± 8.7 × 10 ⁶	14.9 ± 21.0 × 10 ⁶	4.9 ± 4.0 × 10 ⁶	19.7 ± 5.4 × 10 ⁶	63.2 ± 89.4	28.6 ± 28.4	21.9 ± 29.8	
Y2	28.2 ± 0.7 × 10 ⁶	31.7 ± 14.1 × 10 ⁶	1.9 ± 2.6 × 10 ⁶	19.4 ± 2.8 × 10 ⁶	40.5 ± 12.0 × 10 ⁶	5.8 ± 8.2	49.0 ± 7.6	27.4 ± 19.8	
Y1Y2 (Food industry-familiar species)	38.7 ± 16.1 × 10 ⁶	14.8 ± 8.6 × 10 ⁶	22.0 ± 29.7 × 10 ⁶	10.4 ± 6.0 × 10 ⁶	43.1 ± 13.4 × 10 ⁶	40.9 ± 57.8	27.5 ± 22.5	11.8 ± 9.8	
L2	61.2 ± 16.3 × 10 ⁶	0.5 ± 0.6 × 10 ⁶	77.0 ± 13.2 × 10 ⁶	<0.01 × 10 ⁶	61.7 ± 16.8 × 10 ⁶	126.6 ± 13.2	< 0.1	0.7 ± 0.7	
L3	133.7 ± 2.8 × 10 ⁶	73.4 ± 34.4 × 10 ⁶	130.4 ± 16.5 × 10 ⁶	<0.1 × 10 ⁶	207.0 ± 37.3 × 10 ⁶	63.3 ± 3.4	< 0.1	34.5 ± 10.5	
L2Y3	22.7 ± 2.3 × 10 ⁶	2.6 ± 1.8 × 10 ⁶	23.7 ± 4.7 × 10 ⁶	<0.01 × 10 ⁶	25.2 ± 4.2 × 10 ⁶	96.6 ± 34.8	< 0.1	9.8 ± 5.7	
L3Y3	56.0 ± 13.2 × 10 ⁶	13.3 ± 3.8 × 10 ⁶	61.2 ± 4.9 × 10 ⁶	<0.01 × 10 ⁶	69.3 ± 9.3 × 10 ⁶	89.6 ± 19.2	< 0.1	19.7 ± 8.1	
Y3	41.5 ± 55.4 × 10 ⁶	5.3 ± 4.0 × 10 ⁶	43.0 ± 59.4 × 10 ⁶	0.6 ± 0.2 × 10 ⁶	46.1 ± 59.7 × 10 ⁶	48.1 ± 68.0	10.2 ± 13.7	25.0 ± 23.1	

Data is shown as mean ± SD based on replicate trials.

Table 19. Analysis of variance to test differences in proportions of halophilic contaminant bacteria among the fermented *Undaria* cultures prepared with different starter compositions

Microorganisms	Groups	n	Kruskal Wallis test	Games-Howell test
LAB			<i>P</i> < 0.01	
	No LAB	10		-
	B5201	8		<i>P</i> < 0.05
	<i>L. acidophilus</i> (<i>casei</i> -type)	4		<i>P</i> < 0.05
	<i>L. plantarum</i>	4		<i>P</i> > 0.05
Yeast			<i>P</i> > 0.05	
	No yeast	8		
	Y5201	4		
	Y5206	4		
	<i>S. cerevisiae</i>	6		

Effect of inoculation of lactic acid bacteria (LAB) and yeast was analysed individually by the Kruskal Wallis test. For the case of yeast, groups inoculated with a combination of Y5201 and Y5206 were eliminated. Then, the LAB groups having significant effects were further compared by the Games-Howell test against the no LAB group.

に $P < 0.05$)。

菌種特異的プライマーを使用した菌種レベルでの乳酸菌相の解析

菌数を計数する目的で調製された標準寒天培地上に形成されたコロニーを無作為に10個選択し、新しいBCP平板上に移植して純粋分離した後、第4章第1節で開発した菌種特異的プライマーを使用する方法により、乳酸菌の菌種を特定した (Table 20)。まずスターター非添加の対照区においても、2本立ての試料で、*L. brevis* がそれぞれ1株/10株および7株/8株 (陽性株数/試験株数) であった。一方、*L. brevis* を接種した試験区においては、酵母を同時に接種しているか否かに関わらず、全ての試験区 (L1Y1Y2, L1, L1Y1, L1Y2) において2本立て試料とも、*L. brevis* が10株/10株の割合で検出された。一方、酵母を単独接種した試験区では、1試料で*L. brevis* が8株/8株の割合で検出されたものの、他の試料では、酵母の組み合わせにかかわらず、乳酸菌が優占しない場合が多かった (6試料中4試料)。食品産業に実績のある乳酸菌種である *L. acidophilus* および *L. plantarum* を単独で接種した試験区においては、接種した菌種と一致する菌種の検出割合は、それぞれ10株/10株、7株/9株および9株/10株、5株/10株であった。なお、*L. acidophilus* IAM10074は、*acidophilus* 特異的プライマーに反応せず、これらの乳酸菌に *S. cerevisiae* を併用した試験区 (L2Y3, L3Y3) においては、*casei* 特異的プライマーに反応したため、*casei* 特異的プライマーで検出した結果を示してある。*L. acidophilus* および *L. plantarum* の検出割合は、

それぞれ3株/9株、0株/10株および9株/10株、6株/10株であった。*S. cerevisiae* を単独接種した試験区 (Y3) では、1試料でのみ乳酸菌が優占し、残りの1試料では *L. plantarum* が9株/10株の割合で検出された。

PCR-RAPD 法を使用した酵母菌相の解析

菌数を計数する目的で調製されたSBR5寒天培地上のコロニーの形態学的特徴から、コロニーをY1 (Y5201) 型およびY2 (Y5206) 型に分類してTable 21に示した。コロニーの形態学的な特徴からのタイピングが正しいことを検証するため、形成されたコロニーを無作為に10個選択し、PCR-RAPD法によるタイピングを平行して実施した。試験区L1Y1Y2およびY1Y2については、形態学的にY1とされたコロニーから10株、Y2とされたコロニーから10株を無作為に選んでPCR-RAPD法により試験した。まずスターター非添加の対照区、乳酸菌単独接種区 (L1, L2, L3), L2Y3区およびL3Y3区においては、酵母が優占しなかった。次に野生型コンソーシアムを接種したL1Y1Y2区においては、コロニーの形態学的特徴から2本立ての試料において平均でY1型が2.2%、Y2型が97.8%と見積もられた。PCR-RAPD法で調べた結果からは、これらY1型とした株のそれぞれ8株/10株 (分類型が一致した株数/試験株数) および6株/6株がY1型であった。一方、Y2型とした株のそれぞれ10株/10株および10株/10株がY2型であった。一方、Y1を接種したL1Y1区およびY1区から分離された酵母は、形態学的特徴から>99%および>96% Y1型であるとされ、PCR-RAPD法

Table 20. Results of identification of lactic acid bacteria isolated from fermented *Undaria* using species-specific primers

Starter compositions	Typing based on PCR products:					
	Trial No. 1			Trial No. 2		
	<i>brevis</i>	<i>casei</i>	<i>plantarum</i>	<i>brevis</i>	<i>casei</i>	<i>plantarum</i>
No-starter cultures (Wild type strains)	1/10	NT	NT	7/8	NT	0/8
L1Y1Y2	10/10	NT	NT	10/10	NT	NT
L1	10/10	NT	NT	10/10	NT	NT
L1Y1	10/10	NT	NT	10/10	NT	NT
L1Y2	10/10	NT	NT	10/10	NT	NT
Y1	(LAB was not predominant)			NT	NT	NT
Y2	(LAB was not predominant)			(LAB was not predominant)		
Y1Y2	(LAB was not predominant)			8/8	NT	NT
(Food industry-familiar species)						
L2	NT	10/10	NT	NT	7/9	NT
L3	NT	NT	9/10	NT	NT	5/10
L2Y3	NT	3/9	NT	NT	0/10	NT
L3Y3	NT	NT	9/10	NT	NT	6/10
Y3	NT	NT	9/10	(LAB was not predominant)		

Data is shown as the number of positive reacted/tested isolates with the species-specific primer set.

Table 21. Typing of yeast strains isolated from fermented *Undaria* based on morphological characteristics of the colonies and the PCR-RAPD products with the OPA-3 primer

Starter compositions	Typing based on morphological characteristics of colonies ^{*1}	Typing based on PCR products:							
		Trial No. 1				Trial No. 2			
		Y1-type	Y2-type	Y3-type	Other types	Y1-type	Y2-type	Y3-type	Other types
No-starter cultures (Wild type strains)	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
L1Y1Y2 ^{*2}	Y1-type (2.2%)	8/10	0/10	0/10	2/10	6/6	0/6	0/6	0/6
	Y2-type (97.8%)	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10
L1	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
L1Y1	Y1-type (>99%)	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10
L1Y2	Y2-type (>99%)	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10
Y1	Y1-type (>96%)	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10
Y2	Y2-type (>99%)	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10
Y1Y2 ^{*2}	Y1-type (3.5%)	9/10	0/10	0/10	1/10	9/10	0/10	0/10	1/10
	Y2-type (96.5%)	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10
(Food industry-familiar species)									
L2	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
L3	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
L2Y3	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
L3Y3	(Not estimated)	(Yeast was not predominant.)				(Yeast was not predominant.)			
Y3	(Not estimated)	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	1/10	9/10

^{*1} Proportions of yeast colonies were estimated based on morphological characteristics: White and rough colonies with the size of 2.5–6.0mm in diameter after 2 weeks-culture were grouped to the Y1-type while pale white and smooth colonies with the size of 1.5–3.5mm were grouped to the Y2-type. Y3-type has little morphological characteristics and was not be estimated. Y1; Y5201-type, Y2; Y5206-type, Y3; *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512-type.

^{*2} 10 colonies were isolated from the colonies judged as the Y1-type based on morphological characteristics of the colony for each trial. Another 10 colonies were isolated from the colonies judged as the Y2-type based on morphological characteristics of the colony for each trial.

による試験でも、2試料区とも、10株/10株がY1型であると確認された。Y2を接種したL1Y2区およびY2区から分離された酵母も、形態学的特徴から>99%Y2型であるとされ、PCR-RAPD法による試験でも、2試料区とも、10株/10株がY2型であると確認された。Y1Y2区においては、Y1型とした株の9株/10株が両試料ともY2型であった。一方、両試料ともY2型とした株の10株/10株がY2型であった。*S. cerevisiae* IAM 4512株を接種したY3区においては、1試料において10株/10株がY3型であると確認されたが、残りの1試料では1株/10株がY3型であるとされ、残りの9株は、その他の型に分類された。

考 察

野生型コンソーシアムおよび食品型コンソーシアムについて、スターターの菌種組成を変えて接種して発酵を実施した。発酵処理後の単細胞粒子画分の体積割合(%)は、72.8%(Y2区)から80.0%(L2Y3区)であり、スターター非接種対照区の75.4%を含め、全ての試験区で70%を超えており、スターターの組成が単細胞性粒子の生成効率に与える影響は、小さいと考えられた。乳酸生成量については、L-乳酸しか測定していないが、L-乳酸産生量は、pH値の低下

傾向とほぼ相関していた。乳酸発酵のタイプからいうとL1(B5201)株は、ヘテロ型であり、L2(IAM 10074)株およびL3(IAM 12477)株は、ホモ型で後者は前者に比べて、単位グルコース基質あたりの乳酸生成量が2倍量である。L-乳酸生成量を試験区間で比較すると、混入菌(非接種菌)の生育の影響があるため、数値にばらつきが認められるものの、L1接種区(L1Y1Y2, L1, L1Y1, L1Y2)に比べL2接種区(L2, L2Y3)およびL3接種区(L3, L3Y3)では、L-乳酸が2~3倍量生成しており、pH値の低下幅も大きく、静菌効果の点で有利と考えられた。一方、酵母単独接種区(Y1, Y2, Y1Y2, Y3)のL-乳酸生成量は、0.44~0.67g/Lで乳酸菌接種区のL-乳酸生成量に比べ少ない傾向にあった。スターター非接種区においては、L-乳酸生成量が1.42g/Lと予想外の高い値を示したが、これは、ワカメ基質由来の乳酸菌が試料中で増殖して優占したためと考えられた。寒天平板法により行った菌相解析の結果からは、スターター非接種対照区においても乳酸菌が出現することが観察されたが、その優占率が65.7%であったのに対し、L1接種区(L1Y1Y2, L1, L1Y1, L1Y2)においては、酵母の接種の有無にかかわらず、乳酸菌が高い優占率(82.4%~94.1%)を示し、乳酸菌接種による菌相制御の効果が認められた。一方、酵母単独接種区(Y1, Y2,

Y1Y2)においては、乳酸菌の優占率が下がり(5.8%~63.2%), MA 計数值からSBR5 計数值を差し引いて得られる好塩性細菌数が高くなる(11.8~27.4%)傾向にあり、酵母の単独接種では、混入菌の生育の抑制は不十分と考えられた。食品型コンソーシアムを構成する菌種を使用しての実験では、L2 接種区(L2, L2Y3)では、L1 試験区の場合と同様に高い乳酸菌優占率(96.6~126.6%)が認められ、食品産業で実績のある菌種でも、海藻発酵スターターとして使用できることが示唆された。L3 接種区(L3, L3Y3)では、L1 およびL2 での試験区より乳酸菌優占率が低い(63.3~89.6%)傾向が認められたが、このときのL3 株がMA 平板上にコロニーを例外的に形成した可能性が考えられ、乳酸菌優占率が過少評価されている可能性がある。その根拠としては、L3 およびL3Y3 試料をMA 平板上に接種して、形成されたコロニーが、大部分直径が小さい(直径1 mm 以下)、白いコロニーで乳酸菌のコロニーの形態学的特徴に似ていたためである。一方、Y3 単独接種試験区(Y3)では、野生型コンソーシアムでの結果と同様、乳酸菌の優占率が低い(48.1%)傾向にあった。

菌種特異的プライマーを使用して、L1 接種区(L1Y1Y2, L1, L1Y1, L1Y2)で優占した乳酸菌を同定した結果(Table 20)、2本立て試料とも10株中10株がL1 と同じ*L. brevis* 型であることが示され、優占率が極めて高いことが示された。一方L2 接種区(L2, L2Y3)およびL3 接種区(L3, L3Y3)では、接種した菌種と同じ菌種と同定される割合が、2本立て試料区間でばらつき、L1 に比べ劣る傾向にあった。PCR-RAPD 法を使用し、酵母分離株の同定をした結果(Table 21)からは、Y1 単独接種区(L1Y1, Y1)およびY2 単独接種区(L1Y2, Y2)においてそれぞれスターターとして添加した菌種が10株中10株の割合で検出され、酵母の菌相を良く制御していることが示された。Y3 単独接種区(L2Y3, L3Y3, Y3)においては、Y3 試験区のみで酵母が優占し、Y3 型の検出率は1 試料で10株/10株と高かったものの残りの1 試料では1 株/10株であり、不安定な優占率であった。Y3 (*S. cerevisiae*)は非好塩性の菌種であり、ワカメ発酵試料が3.5% NaCl の塩濃度下で調製したことが反映した可能性が考えられた。またY1Y2 の混合接種区(L1Y1Y2, Y1Y2)においては、Y2 型が優占(96.5~97.8%)していることが確かめられ、Y1 およびY2 以外の型は、概ね全体の1%以下であろうと推定された。試料中の酵母の存在比がY1 型よりY2 型の方が多かった理由としては、最初の菌の接種量が2 mL あたり3.8

$\times 10^6$ CFU (Y5201株) および 6.2×10^7 CFU (Y5206株)で約16倍の差があることが影響していることが考えられる。なお、この菌体懸濁液は濁度を統一して調製しており、菌体細胞のサイズと逆相関していると考えられる。即ち菌体サイズはY1 > Y2 であり、単独培養した場合に定常期における細胞濃度は、Y1 < Y2 となると予想される。したがって、菌体サイズの違いを反映していると解釈することもできる。試料中の微生物の存在比を考える場合に、細菌と酵母の細胞サイズの違いも考慮して議論する必要がある。濁度 = 1 で統一した菌体懸濁液 2 mL に含まれるL1 細胞の数は 1.6×10^9 CFU であり、Y1 の421倍、Y2 の25.8倍である。このことを考慮すると、例えばY1 試料およびY2 試料でCFU 値を基に算出した酵母の優占率が19.7%および49.0%であることは、かなり酵母が高い優占率を示している例であるという解釈も可能である。実際、これらの試料について顕微鏡観察をすると、細菌細胞より酵母細胞がよく目立つ感じがある。

以上の結果を総括すると、L1 (B5201) 株、Y1 (Y5201) 株、Y2 (Y5206) 株を混合接種する方法で、最初に海藻発酵スターターが開発されたが、乳酸菌L1 の単独接種でも、混入菌の生育抑制の面で効果が同程度認められること、また酵母の単独接種では、細菌相の制御が充分でないことが明らかにされた。また、*L. acidophilus* (L2, ただし16S rDNA 塩基配列は*L. casei* 型)、*L. plantarum* (L3) など食品産業になじみの深い菌種を海藻発酵試料の調製のためのスターターとして使用できる可能性が示唆された。

第3節 乳酸菌種の検討

第4章第2節において海藻の発酵スターターとして使用できる微生物の組み合わせとして乳酸菌単独での使用で問題がないこと、また乳酸菌の種類としても必ずしも*L. brevis* B5201株でなくとも他の乳酸菌種も使用可能であることが示唆された(Uchida *et al.*, 2004b)。乳酸菌は、発酵形式からホモ型、ヘテロ型に類別される(柳田, 1996)。また、発酵基質との関連から植物系、乳(動物)系という類別の仕方も提案されている(岡田, 1996)。そこで、どのような種類の乳酸菌が海藻発酵スターターとして適しているのか興味もたれる。一方、海藻を基質として乳酸発酵させて産業利用することを考えた場合、海藻基質を滅菌処理して使用することが必ずしも容易でない場合が多い。例えば海藻をオートクレーブ殺菌すると、クロロフィルが分解し、色落ちが著しく、応用的価値を下げることが問題となる。したがって非滅菌処理の海藻基質を使用することを前提として、海藻の発酵技術を開

発することが重要となる。著者らは、入手が容易な市販ワカメ乾燥粉末を基質にして発酵条件を検討してきたが、ワカメ基質を滅菌処理せずそのまま使用した場合、NaClを添加しない条件下で発酵を実施すると、しばしば試料が著しい発泡とともに急速に液状化し、チーズ様の独特の臭気を有する腐敗・変敗状態になることを経験した。このような腐敗・変敗試料では、乳酸菌の他に非乳酸菌の増殖が起こっていると疑われ、基質由来の混入菌の増殖が充分抑制されていないためにおこる現象であると推察された。

そこで、基質として使用したワカメ試料に含まれる生菌相を調べるとともに、いろいろな乳酸菌株についてワカメ基質に対して単独接種して、発酵が進行する過程で優占化することにより、混入菌の生育を抑制する能力に優れた菌種を検索することとした。スターターとしての適性を判断するにあたり、第4章第1節において開発した菌種同定技術により、発酵後の試料中における接種菌種の優占率(%)を調べ、評価の基準として使用した。試験は、NaClを添加した系としない系の両条件で行った。

方 法

ワカメ基質中の菌相解析

市販ワカメ乾燥粉末(若みどりLS, 粒径メッシュ 200通過規格, 理研ビタミン) 0.2gを滅菌蒸留水 10mLに懸濁し、あらかじめ調製し、60℃に保持しておいた30mLの標準寒天培地(以降SMAと略記, 日水製薬), BCP添加プレートカウントアガール(BCP, 日水製薬), マリニアガー(MA, Difco)およびサブ

ロー寒天培地(SBR, 日水製薬)とそれぞれ混積した。各平板試料は、2枚ずつ調製し、20℃で2週間、好気条件下で培養後、コロニーを計数した。計数後、各平板上に形成されたコロニーを1~10個鈎菌し、16S rRNA遺伝子(16S rDNA)の部分塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、第2章と同様の方法で鋳型DNAの抽出およびPCR増幅を行って実施した。決定された塩基配列を基に分子系統樹を作成した。

供試乳酸菌

Table 22に示す11種14株の乳酸菌を14試料(a, b)の調製に使用した。これらのうち*L. casei*として使用したIFO15883^T株は、16S rRNA遺伝子塩基配列(*E. coli* 27-338番塩基部位)が*L. plantarum*型であり、*L. casei*特異的プライマーにも反応しなかったため、*L. plantarum*特異的プライマーで検出した。

海藻発酵試料の調製

NaCl添加ワカメ発酵試料(試料No. 1a-14a)の調製には、ワカメ乾燥粉末(LS) 2gおよびセルラーゼ(12S, ヤクルト本社, 東京) 40mgを滅菌NaCl水溶液(3.5% w/v) 40mLとともに、50mL容のPP製遠チューブ(イワキ)に入れ、さらに菌体懸濁液 0.4mLを添加して、スクリュウキャップを閉じた状態でよく振って混合した。菌体懸濁液は、乳酸菌をMRS(Merck, Darmstadt, Germany)培地で前培養し、滅菌0.85%濃度NaCl水溶液で1回遠心洗浄後、同食塩水に対してOD_{660nm}=1.0(7.3×10⁷~1.1×10⁹CFU/mL)の濃度で菌体を懸濁させて調製した。NaCl非添加ワカメ発酵試料(試料No. 1b-14b)の調製には、滅

Table 22. List of lactic acid bacteria used as a starter

No.	Lactic acid bacteria	Characteristics of the strains	
		Isolation source	Fermentation type
1	<i>Lactobacillus brevis</i> B5201(=FRA000033)	Seaweed	Hetero
2	<i>Lactobacillus brevis</i> IAM 12005	(Not clear)	Hetero
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> YIT0102 ^T (=ATCC 14917)	Pickled cabbage	Homo
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM 12477 ^T	Pickled cabbage	Homo
5	<i>Lactobacillus casei</i> IFO 15883 ^T	Cheese	Homo
6	<i>Lactobacillus casei</i> B5406(=FRA 000035)	Seaweed	Homo
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IAM 1118 ^T	Dairy product	Homo
8	<i>Lactobacillus zeae</i> IAM 12473 ^T	Cheese	Homo
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951 ^T	Feces	Homo
10	<i>Lactobacillus kefir</i> YIT 0222 ^T (=NRIC 1693)	Kefir grains	Hetero
11	<i>Lactobacillus fermentum</i> YIT 0081 ^T (ATCC 14931)	Fermented beets	Hetero
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT 0181 ^T (ATCC 11842)	Bulgaria yogurt	Hetero
13	<i>Streptococcus thermophilus</i> YIT 2094 (NCFB 2392)	Yogurt starter	Homo
14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IAM 13004 ^T	Olive	Hetero
15	No Lactic acid bacteria	-	-
16	Mixture ^{*1}	-	-

*1 The mixture contains 36 μL each of lactic acid bacteria suspensions of No. 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14.

菌3.5% (w/v) 濃度 NaCl 水溶液のかわりに蒸留水を使用して調製した。スターター非接種のものを対照試料区として調製した(試料 No. 15a, 15b)。乳酸菌混合接種区(試料 No. 16a, 16b)においては, 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14の各試験区に使用された菌体懸濁液を36 μ L ずつ接種した。菌体接種後, 発酵試料は, 20°C 下で毎日1回数秒間手で振って混合しながら11日間培養を行った。発酵試料は, 各3本立てで調製した。

発酵試料の性状評価

発酵後の試料について, 臭気を官能的に評価し, 発酵臭および腐敗臭の有無を記載した。また, pH 値, 乳酸生成量, ガスの産生の有無, 固形分含量(%), 生菌数, 乳酸菌優占率(%)を測定した。乳酸生成量は, 市販キット(F kit D-/L-乳酸, Roche Diagnostics)を使用して測定した。固形分含量(%)は, 発酵試料を1時間以上静置した後の, 海藻固形分の容積の量を容器の側面についた目盛りから読み取り, 発酵試料全体の容積41mL に対する割合(%)で示した。従属栄養微生物の生菌数は, NaCl 添加発酵試料区については, 標準寒天培地(日水製薬)に2.5%濃度 NaCl を添加した平板(SMA2.5)で, NaCl 非添加発酵試料区については標準寒天培地(SMA)で計数した。スターター非接種対照区(試料 No. 15a, 15b)については, 優占種として生育してくる菌種を予想できないため, BCP 添加プレートカウントアガール(BCP, 日水製薬)およびマリンアガー(MA, Difco)も併用して生菌数を測定した。SMA2.5平板もしくはSMA 平板上に形成されたコロニーから無作為に10菌株($\times 3$)選択し, 新しいBCP 平板に移植し, 20°C で1週間培養後にコロニーの周囲が黄変するものを乳酸菌とみなし, 全30分離株中の乳酸菌優占率(%)を算出した。

発酵試料中の乳酸菌種の解析

各試料について3本立て試料から得られた合計30株の分離株について, 第4章第1節で開発した菌種特異的プライマー(Table 14)を使用する方法で菌種を特定した。菌体DNAの抽出は, 30 μ L のTEバッファーに平板コロニーから掻き取った少量の菌体を懸濁させ, 94°C で15分間加熱することで行い, 加熱後の遠心(12000rpm, 10分)上清1 μ L を鋳型DNAとして使用した。PCR増幅は, MgCl₂ 2mM, dNTP 混液各200 μ M, 鋳型DNA 1 μ L, プライマー 各1.0 μ M, DNAポリメラーゼ(Ex Taq, 宝酒造, 東京) 2.5U を含む100 μ L の反応液を添付バッファーを用いて調製して行った。PCRの反応条件は, 94°C で3分保持後

94°C 20秒, 55°C 20秒, 72°C 30秒を30サイクル行い, 最後に72°C で5分保持した。一部の菌種(*L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. kefir*, *L. fermentum*)に対する特異的プライマーについては, アニーリング温度を58°C に変えてPCR増幅を行った。*L. kefir*の検出プライマーに陽性反応の株は, *L. fermentum*の検出プライマーでクロスチェックを行い, 陰性の株を*L. kefir*とした。増幅産物は, 1%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロミドで染色して観察した。

発酵試料中の非乳酸菌種の解析

非乳酸菌の生育と腐敗臭が認められた試料2b, 8b, 9b, 11b, 12b, 13b, 15bについて, 生菌数測定に使用したSMA上に形成されたコロニーを1~30個無作為に選択し, 新しいBCP 平板に移植して分離し, 合計102株を得た。これらの分離株をコロニーの形態学的特徴から, C型, S型, その他に類別した。コロニーの形態学的特徴の観察による類別は, 白金耳を使用して新しいBCP 平板にコロニーを画線後, 20°C 下で5日間培養した時点で行った。コロニーの直径が2~6mm, クリーム色, 表面が滑らか, 周辺に凹凸なし, 湿った感じの特徴を有するものをC型, 直径が5-10mm, 白色, 平坦, 周辺が凹凸状, 乾いた感じの特徴を有するものをS型とした。次にC型, S型とされた菌株について, 各試料ごとに1株ずつ合計11株を代表株として選び, その16S rDNAの部分塩基配列を, 第2章と同様の方法で決定した。決定された塩基配列をもとに分子系統樹を作成した。

塩基配列のアクセッション番号

本研究で決定された塩基配列情報は, DDBJに登録した。分離菌株とそれぞれのアクセッション番号は, A0001 (AB124858), A0002 (AB124859), A0003 (AB124860), A0004 (AB124861), A0005 (AB124862), A0006 (AB124863), A0007 (AB124864), A0008 (AB124865), A0009 (AB124866), A0010 (AB124867), A0011 (AB124868), A0012 (AB124869), A0013 (AB124870), A0801 (AB124871), A1201 (AB124872), A1301 (AB124873), A0901 (AB124874), A1205 (AB124875), A0916 (AB124876), A1308 (AB124877)である。系統解析に使用した参照株の名称とアクセッション番号は, *Alicyclobacillus cycloheptanicus* 1457 (X51928), *Bacillus atrophaeus* NCIMB 12899^T (X60607), *Bacillus cereus* NCTC 11143 (X55063), *B. cereus* (AJ577291), *Bacillus circulans* IAM 12462^T (D78312), *Bacillus fusiformis* (AF169537), *Bacillus lentus* IAM 12466^T (D16272),

Bacillus megaterium IAM 13418^T (D16273), *Bacillus pumilus* (AB048252), *Bacillus subtilis* NCDO 1769 (X60646), *Bacillus sphaericus* (AF169495), *Bacillus sphaericus-like* strains B23284 (AF169502), NRS-111 (AF169526), NRS-1198 (AF169528), NRS-800 (AF169544), NRS-1691 (AF169531), BD-87 (AF169520), *Bacillus thermosphaericus* strain P-11 (X90640), *Bacillus thuringiensis* (AF155955) である。

結 果

ワカメ基質中に含まれる生菌数および菌種組成

最初に発酵試料の調製に使用されるワカメ基質中に含まれる生菌数を調べた (Table 23)。形成されたコロニーの大部分が不定形であること、寒天培地上だけでなく培地中でのコロニーの形成が観察されること、ワカメ粒子が培地中に存在して観察を妨げることなどから、正確なコロニーの計数は困難であったが、最も多くのコロニーが計数されたのはBCP平板を使用した場合で、概ね $10^2 \sim 10^3$ CFU/gであった。また、BCP上に形成されたコロニーは全て、周囲が黄色に変化しておらず非乳酸菌であると判断された。SMAおよびMAにより見積もられた生菌数はそれぞれ 10^2 CFU/g, 20 CFU/gであった。SBRによる計数では、酵母、糸状菌は検出されなかった (<5 CFU/g)。

生菌数の計数に使用したSMAから1株、MAから2株、BCPから10株を分離した。これらの分離菌株について16S rDNAの部分塩基配列を決定し、これをもとに分子系統樹を作成した (Fig. 14)。分離された13菌株は、全て *Bacillus* 属細菌であり、7株が *Bacillus sphaericus* のクラスター、2株が *Bacillus cereus* のクラスター、2株が *Bacillus pumilus* のクラスター、1株が *Bacillus subtilis* のクラスター、その他が1株であった。

発酵試料の性状比較

最初にNaCl添加条件下で調製したワカメ発酵試料の性状分析の結果を Table 24に示す。官能臭気による類別では、試料15a (スターター非添加対照区) の他、8a, 9a, 11a, 13aで、3本のうち1~2本で腐敗臭が感じられた。腐敗臭はアミン系およびイオウ系の臭気が混ざっているように感じられた。pH値は、3本試料の平均値の比較では、試験区の違いによる明瞭な傾向はなく、どの試験区も一律低いpH値 (4.0~4.9) を示したが、同じ試験区の3本のなかで比較すると腐敗臭が感じられた試料は、pH値がやや高め、乳酸生成量も小さい傾向があった (データを示さず)。乳酸生成量は、ヘテロ型乳酸菌試験区 (1a, 2a, 12a) およびスターター非添加対照区 (15a) で少なく (0.45~0.83 g/L)、腐敗試料が観察された9aを除くホモ型乳酸菌試験区 (3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a) および混合接種区 (16a) で高い傾向にあった (1.64~2.20 g/L)。ガスの産生は全ての試料で認められなかった。試料の液状化も認められなかったが、浸透圧の影響によると推定される海藻固形分体積の減少が全ての試料について認められた (発酵開始時に対する発酵終了時の固形分体積率: 70.7~81.3%)。生菌数については、 1.5×10^7 CFU/mL ~ 13.3×10^8 CFU/mL の範囲で計数され、菌種の違いによる明瞭な傾向は認められなかった。SMA平板から分離された分離菌株 (各試料 n=30) から推定した乳酸菌の存在比率 (%) は、試験区1a, 2aで96.7%, 試験区3a~12a, 14a, 16aで100%, 試験区13aで60%, 対照区 (15a) で<3.3%であった。

次にNaCl非添加条件下で調製したワカメ発酵試料の性状分析の結果を Table 25に示す。官能臭気による類別では、試料15b (スターター非添加対照区) の他、1b, 2b, 8b, 9b, 11b, 12b, 13b, 14bで、3本のうち1~3本でチーズ臭もしくは腐敗臭が感じられた。pH値は、3本試料の平均値の比較では、4.3~5.3の値を示し、NaCl添加条件下で調製した試料に比べや

Table 23. Viable number of microorganisms contained in the substrate of *Undaria pinnatifida* product

Counting media	Viable counts (CFU/g)	No. of isolates for phylogenetic analysis	Strain No.
Standard Method Agar	10^2	1	A0001
Marine Agar 2216	20	2	A0002, A0003
Plate Count Agar with BCP (yellow-colored colony)	$10^2 \sim 10^3$ [*] (< 10^2)	10 -	A0004-A0013 -
Sabouraud Agar	<5	-	-

^{*} Predominant microorganisms made vague and irregular-shaped colonies and exact numerical estimation of the colonies were difficult.

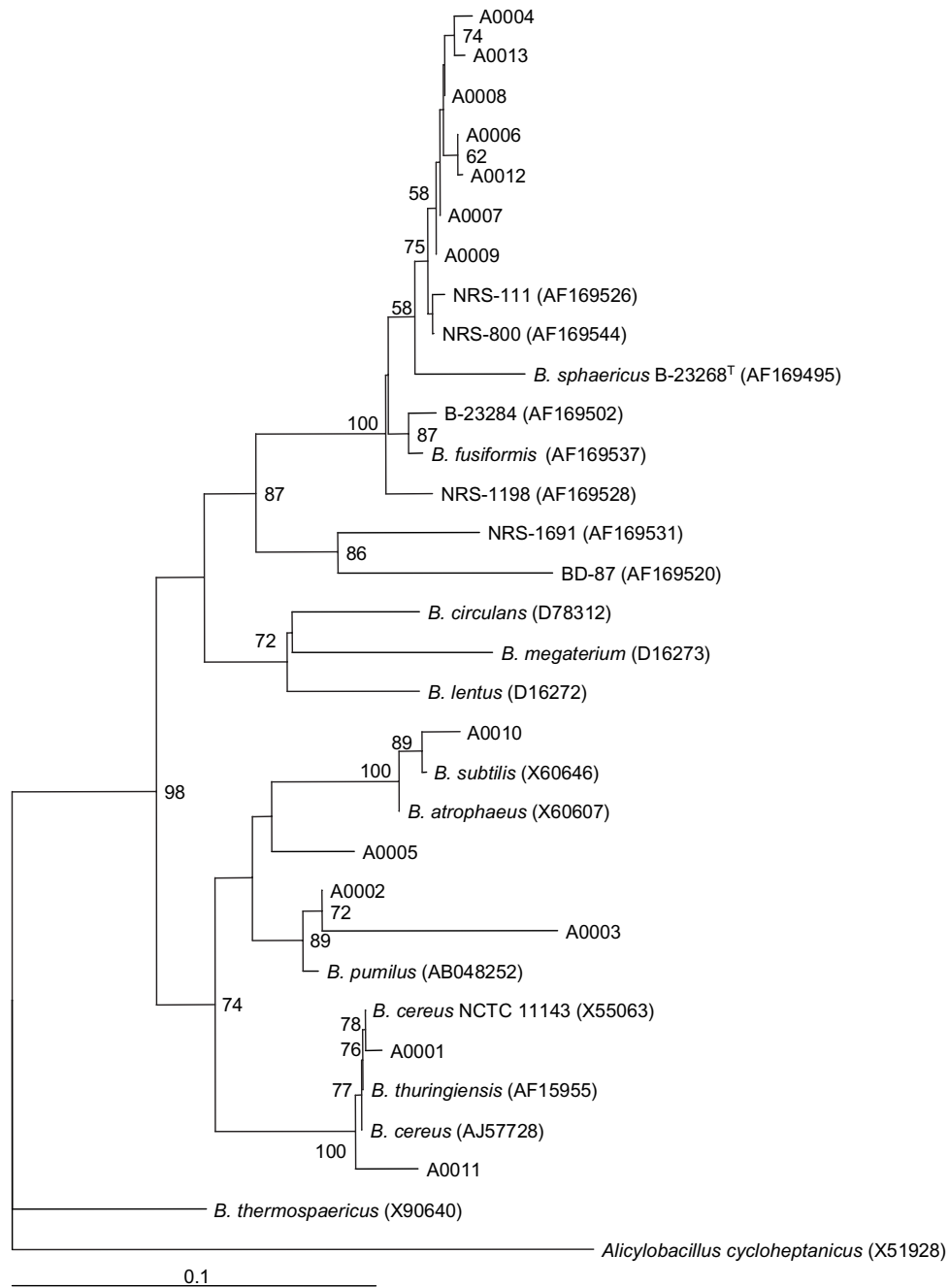


Fig. 14. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of the bacteria isolated from the *Undaria* LS product among the *Bacillus* groups. The analysis is based on 291 nucleotide sequences of 16S rRNA gene. Confidence limits estimated from bootstrap analysis (100 replications) appear at the nodes. *Alicyclobacillus cycloheptanicus* was designated as the outgroup species for the analyses. Nucleotide sequences obtained from GenBank and used in the phylogenetic analyses were as follows: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* 1457 (X51928), *Bacillus atrophaeus* NCIMB 12899^T (X60607), *Bacillus cereus* NCTC 11143 (X55063), *B. cereus* (AJ577291), *Bacillus circulans* IAM 12462T (D78312), *Bacillus fusiformis* (AF169537), *Bacillus lentus* IAM 12466T (D16272), *Bacillus megaterium* IAM 13418T (D16273), *Bacillus pumilus* (AB048252), *Bacillus subtilis* NCDO 1769 (X60646), *Bacillus sphaericus* (AF169495), *Bacillus sphaericus*-like strains B23284 (AF169502), NRS-111 (AF169526), NRS-1198 (AF169528), NRS-800 (AF169544), NRS-1691 (AF169531), BD-87 (AF169520), *Bacillus thermosphaericus* strain P-11 (X90640), *Bacillus thuringiensis* (AF155955).

Table 24. Results of fermentation of *Undaria pinnatifida* with NaCl-added cultures

Culture No.	Added lactic acid bacteria	Fermented /Rotten* ¹	pH	Lactic acid production (g/L)	Gas	%Solid part /total volume* ²	Viable counts (CFU/mL)* ³	%Proportion of LAB* ⁴
1a	<i>L. brevis</i>	F/F/F	4.8	0.68	-	74.8	1.7 x10 ⁸	96.7 ± 3.3
2a	<i>L. brevis</i>	F/F/F	4.9	0.65	-	70.7	1.2 x10 ⁸	96.7 ± 3.3
3a	<i>L. plantarum</i>	F/F/F	4.1	2.12	-	74.4	1.3 x10 ⁸	100 ± 0.0
4a	<i>L. plantarum</i>	F/F/F	4.1	2.20	-	73.2	1.1 x10 ⁸	100 ± 0.0
5a	<i>L. casei</i>	F/F/F	4.1	1.99	-	73.2	1.8 x10 ⁸	100 ± 0.0
6a	<i>L. casei</i>	F/F/F	4.1	1.66	-	72.8	2.4 x10 ⁸	100 ± 0.0
7a	<i>L. rhamnosus</i>	F/F/F	4.1	1.64	-	72.0	3.0 x10 ⁸	100 ± 0.0
8a	<i>L. zeae</i>	F/R/R	4.2	1.65	-	73.2	2.3 x10 ⁸	100 ± 0.0
9a	<i>L. acidophilus</i>	F/F/R	4.9	0.55	-	73.2	2.7 x10 ⁷	100 ± 0.0
10a	<i>L. kefir</i>	F/F/F	4.1	ND	-	73.2	7.5 x10 ⁷	100 ± 0.0
11a	<i>L. fermentum</i>	F/F/R	4.1	ND	-	73.6	2.1 x10 ⁸	100 ± 0.0
12a	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	F/F/F	4.4	0.83	-	75.6	2.8 x10 ⁷	100 ± 0.0
13a	<i>S. thermophilus</i>	R/R/R	4.9	ND	-	79.3	1.5 x10 ⁷	60.0 ± 20.0
14a	<i>L. mesenteroides</i>	F/F/F	4.2	ND	-	73.2	3.3 x10 ⁸	100 ± 0.0
15a	No lactic acid bacteria	F/R/R	4.9	0.45	-	76.4	1.5 x10 ⁷	<3.3
16a	Mixture* ²	F/F/F	4.0	1.70	-	81.3	1.8 x10 ⁸	100 ± 0.0

*¹ Samples with and without unacceptable odors were judged as rotten (R) and fermented (F), respectively. Results are based on three replicates. For other tests (pH, Lactic acid production, solid part proportion, viable count), the results were shown as average.

*² Solid part volume was estimated by observing the upper level of algal substances after leaving the suspensions stay for more

*³ Counted on Standard method Agar.

*⁴ 10 colonies each formed on the SMA plates prepared for the viable counting were chosen at random from the triplicated trials (Total n=30), transferred to the BCP plates and the %proportion of the yellow-colored colonies is shown as average ± SE of lactic acid bacteria.

Table 25. Results of fermentation of *Undaria pinnatifida* with NaCl-less cultures

Culture No.	Added lactic acid bacteria	Fermented /Rotten* ¹	pH	Lactic acid production (g/L)	Gas	%Solid part /total volume* ²	Viable counts (CFU/mL)* ³	%Proportion of LAB* ⁴
1b	<i>L. brevis</i>	F/R/F	4.9	0.43	-	100	9.5 x10 ⁷	96.7 ± 3.3
2b	<i>L. brevis</i>	R/R/R	5.3	<0.1	+	52.8	1.2 x10 ⁸	90.0 ± 10.0
3b	<i>L. plantarum</i>	F/F/F	4.3	1.84	-	100	5.5 x10 ⁸	100 ± 0.0
4b	<i>L. plantarum</i>	F/F/F	4.3	1.85	-	100	7.6 x10 ⁸	100 ± 0.0
5b	<i>L. casei</i>	F/F/F	4.3	1.59	-	100	6.6 x10 ⁸	100 ± 0.0
6b	<i>L. casei</i>	F/F/F	4.3	1.82	-	100	1.0 x10 ⁸	100 ± 0.0
7b	<i>L. rhamnosus</i>	F/F/F	4.3	1.64	-	100	1.7 x10 ⁸	100 ± 0.0
8b	<i>L. zeae</i>	R/R/R	4.7	1.65	+	65.0	4.9 x10 ⁸	76.7 ± 8.8
9b	<i>L. acidophilus</i>	F/R/R	5.1	ND	+	58.9	2.5 x10 ⁸	33.3 ± 17.6
10b	<i>L. kefir</i>	F/F/F	4.5	ND	+/-	72.4	1.1 x10 ⁹	93.3 ± 6.7
11b	<i>L. fermentum</i>	F/F/R	4.6	ND	+/-	73.2	9.9 x10 ⁸	93.3 ± 6.7
12b	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	F/R/R	5.2	ND	+	67.5	2.2 x10 ⁸	63.3 ± 8.8
13b	<i>S. thermophilus</i>	R/R/R	5.3	ND	+	41.1	7.4 x10 ⁷	<3.3
14b	<i>L. mesenteroides</i>	F/F/R	5.0	ND	+/-	81.3	4.7 x10 ⁸	100 ± 0.0
15b	No lactic acid bacteria	R/R/R	5.1	0.42	+	52.4	6.2 x10 ⁷	<3.3
16b	Mixture* ²	F/F/F	4.4	1.39	-	100	5.1 x10 ⁸	100 ± 0.0

*¹ Samples with and without unacceptable odors were judged as rotten (R) and fermented (F), respectively. Results are based on three replicates. For other tests (pH, Lactic acid production, solid part proportion, viable count), the results were shown as average.

*² Solid part volume was estimated by observing the upper level of algal substances after leaving the suspensions stay for more than 1h.

*³ Counted on Standard method Agar.

*⁴ 10 colonies each formed on the SMA plates prepared for the viable counting were chosen at random from the triplicated trials (Total n=30), transferred to the BCP plates and the %proportion of the yellow-colored colonies is shown as average ± SE of lactic acid bacteria.

や高い数値を示した。また、腐敗と判定された試料で、高めの pH 値を示した。乳酸生成量は、ヘテロ型乳酸菌試験区 (1b, 2b) およびスターター非添加対照区 (15b) で少なく (<0.1~0.43 g/L)、ホモ型乳酸菌試験区 (3b, 4b, 5b, 6b, 7b, 8b) および混合接種区 (16b) で高い傾向にあった (1.39~1.85g/L)。ガスの

産生は、腐敗臭が認められた試料のうちのほぼ全てで観察された (2b, 8b~15b)。NaCl 非添加区では、浸透圧の影響による海藻固形分体積の減少は観察されなかったが、ガスの産生した試験区 (2b, 8b~15b) では、試料の液化化が観察され、海藻固形分体積の減少につながった (固形分体積率: 41.1%~81.3%)。生菌数に

については、 6.2×10^7 CFU/mL \sim 1.1×10^9 CFU/mL の範囲で計数され、接種菌種の違い、発酵/腐敗の違いによる明瞭な傾向は認められなかった。乳酸菌の存在比率(%)は、試験区1b、で96.7%、2bで90.0%、3b~7b、14b、16bで100%、8bで76.7%、9bで33.3%、10b、11bで96.7%、12bで63.3%、13b、15bで<3.3%であった。

菌種特異的プライマーを使用した菌種組成の解析結果

各試験区から分離された合計30株を、BCP平板上での酸産生能、菌種特異的プライマーを使用したPCR試験にかけ、接種した菌と同一種の乳酸菌株、接種した菌と種が異なる乳酸菌株、非乳酸菌株の3つに類別し、その割合をFig. 15 (NaCl添加区)、Fig. 16 (NaCl非添加区)に示した。NaCl添加試料では、試験区1a~7aで接種した菌種の優占率が高く(90.0%~100%)、他の試験区(8a~14a)や対照区(15a)では、極端に低かった(0%~13.3%)。NaCl非添加試料でもほぼ同様の傾向が観察され、試験区1a~7aで接種した菌種の優占率が高く(63.3%~100%)、他の試験区(8b~14b)や対照区(15b)では、極端に低かった(0%~20%)。高い優占率を示した菌種は、*L. brevis*、*L. plantarum*、*L. casei*、*L. rhamnosus*であった。

混合接種した試験区では、NaCl添加試料(16a)で優占の度合いが高かった菌種とその優占率は、*L. brevis* 36.7%、*L. plantarum* 36.7%、*L. rhamnosus* 26.7%であった(Fig. 17)。一方、NaCl非添加試料(16b)で優占の度合いが高かった菌種とその優占率は、*L. plantarum* 66.7%、*L. rhamnosus* 23.3%、*L. brevis* 3.3%、*L. casei* 3.3%であった。

腐敗試料に出現した菌種

腐敗と判定された試料のうち試料2b、8b、9b、11b、12b、13b、15bについて生菌数計数時に調製したBCP平板からコロニーを分離し、コロニーの形態学的特徴から*B. cereus*型(Type C)、*B. sphaericus*型(Type S)、その他の型(Others)の3つに類別した(Table 26)。全102株中、*B. cereus*型が64株、*B. sphaericus*型が16株で、これら2つの型で、全出現菌の78.4%を占めた。

コロニーの形態的特徴に基づいたType CおよびType Sへの類別が正しいことを確認するため、Type CおよびType Sとされた菌株から1株ずつを各試験区ごとに代表株として選び、合計11株について16S rDNAの部分塩基配列を決定し、分子系統解析を行った(Fig. 18)。全11株のうち6株が*B. cereus*のクラスター、5株が*B. sphaericus*のクラスターに位置し、コロニーの形態からの分類結果と一致した。

考 察

乾燥加工された市販ワカメ粉末試料の生菌数を測定した結果、*Bacillus*属細菌が $10^2 \sim 10^3$ CFU/gレベルで検出された。16S rDNAの部分塩基配列に基づいた系統解析の結果、無作為に分離した13株のうち、*B. sphaericus*のクラスターに位置する菌が7株と約半数を占めたが、安全衛生上問題となる*B. cereus*のクラスターに位置する菌が2株存在した。この菌株が、食中毒の原因種となりうる菌株であるかどうか現時点では不明であるが、ワカメ発酵産物の応用を考える場合に、この*B. cereus*類縁菌を含めて、ワカメ基質由来の混入菌の生育を充分抑制することが安全上重要であ

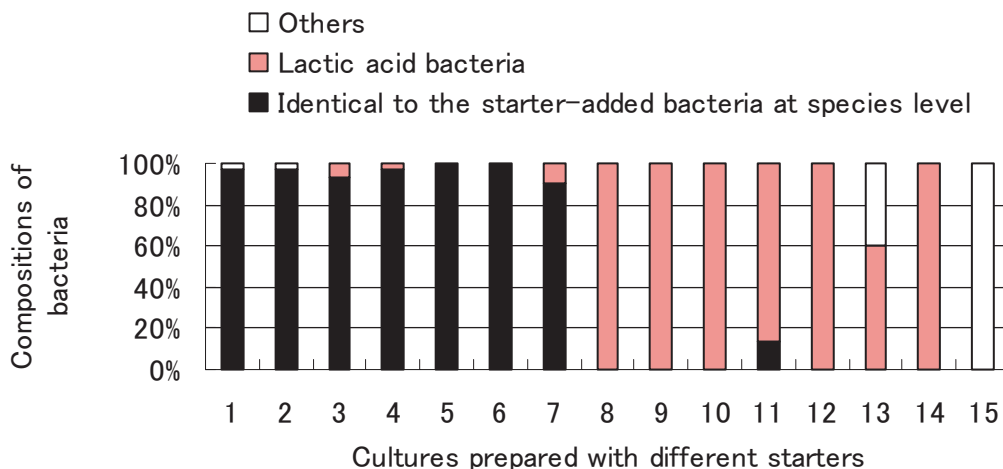


Fig. 15. Proportion of bacteria identical at species level to the starter-added lactic acid bacteria among 30 isolates (Results from NaCl-added cultures)

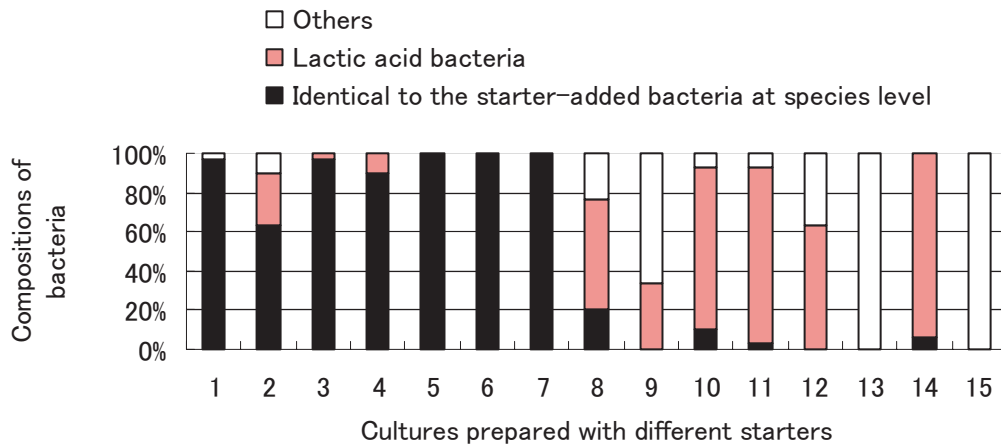


Fig. 16. Proportion of bacteria identical at species level to the starter-added lactic acid bacteria among 30 isolates (Results from NaCl-less cultures)

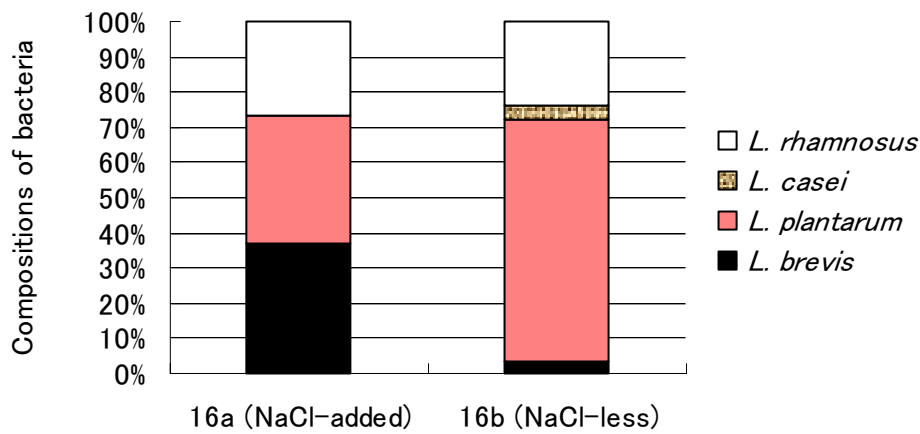


Fig. 17. Proportion of bacteria in the fermented *Undaria* cultures prepared with starter-mixture composed of 11 strains of lactic acid bacteria. Results from NaCl-added (left) and NaCl-less cultures (right)

Table 26. Typing of the bacterial isolates based on morphological characteristics of colony

Culture No. for isolation source	No. of isolates	Typing of isolates based on morphological characteristics of colony* ¹			Isolates used for phylogenetic analysis	
		Type C* ²	Type S* ³	Others	No. of isolates	Strain No.
2b	3	3	0	0	1 (Type C)	A0201
8b	7	3	0	4	1 (Type C)	A0801
9b	20	11	7	2	2 (Types C, S)	A0901, A0916
11b	1	0	1	0	1 (Type S)	A1102
12b	11	9	2	0	2 (Types C, S)	A1201, A1205
13b	30	16	3	11	2 (Types C, S)	A1301, A1308
15b	30	22	3	5	2 (Types C, S)	A1501, A1513
Total No. of isolates (Frequency %)	102 (100)	64 (62.7)	16 (15.7)	22 (21.6)		

*¹ Colonies formed on BCP plates were observed after 5 days-incubation at 20°C.

*² Type C: 2~6 mm of colony size in diameter, cream-colored, smooth-surface and wet appearance

*³ Type S: 5~10 mm of colony size in diameter, white-colored, flat, jaggy-round and dry appearance

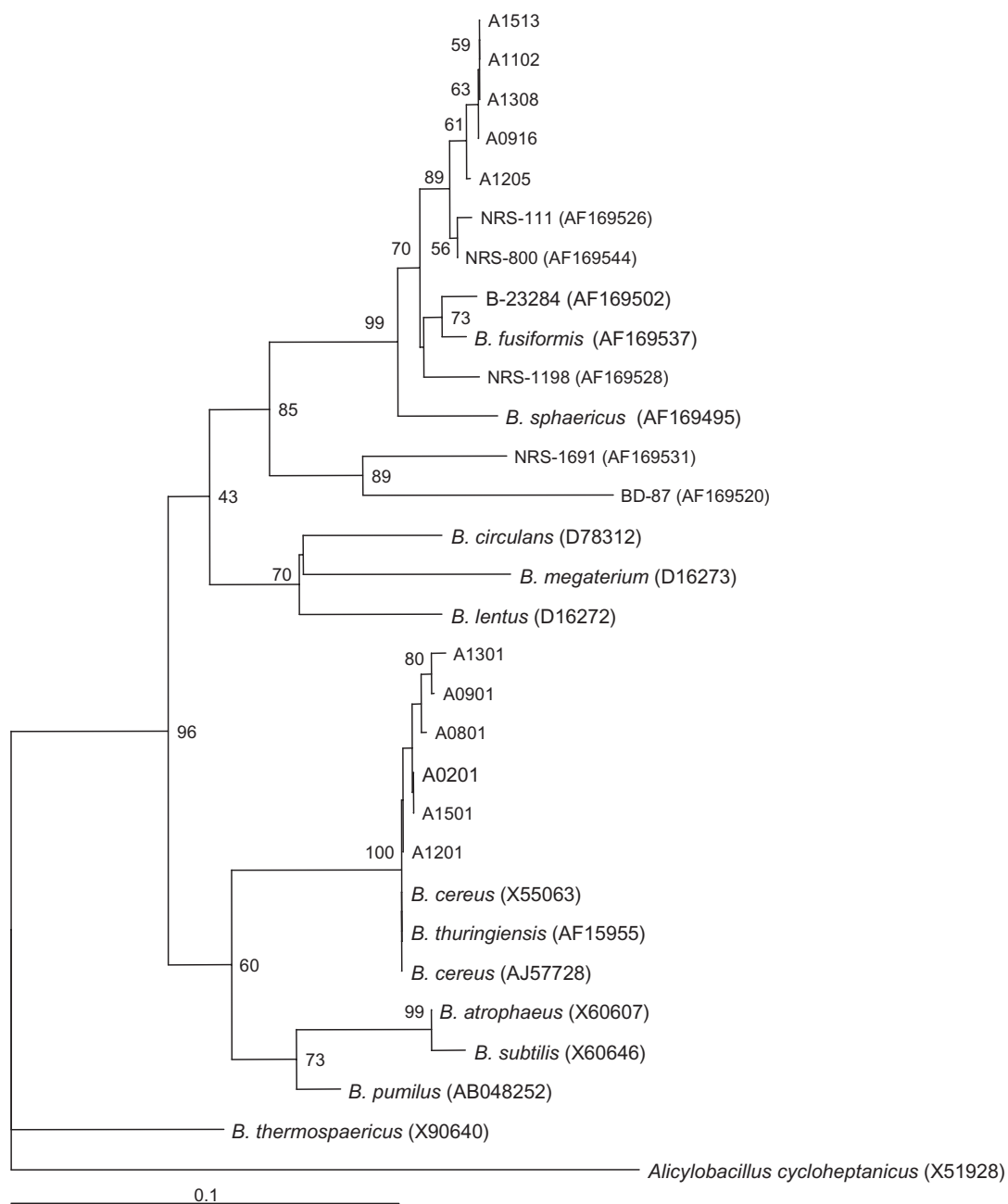


Fig. 18. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of the bacteria isolated from the fermented *Undaria* products among the *Bacillus* groups. The analysis is based on 291 nucleotide sequences of 16S rRNA gene. Confidence limits estimated from bootstrap analysis (100 replications) appear at the nodes. *Alicyclobacillus cycloheptanicus* was designated as the outgroup species for the analyses. Nucleotide sequences obtained from GenBank and used in the phylogenetic analyses were the same as Fig. 14.

ると考えられた。ワカメ基質を加熱（オートクレーブ処理等）により滅菌処理すると、外観等、性状の劣化が著しいため、滅菌手段として使用することは困難である。加熱以外の原理に基づく有効な滅菌手法も現在のところ検討の段階にあり、滅菌処理しないワカメを基質として使用しながら、かつ混入菌の生育を抑制する技術を開発することが必要と考えられた。

一方、前節においてワカメを発酵させるためのスターターとして乳酸菌単独の使用が可能であることが示された。そこで、本節では、多数の乳酸菌種についてこれをスターターとして単独使用して発酵試料を調製し、スターターとして好適な菌種を検索することを目的とした。発酵が順調に達成されない場合におこる問題として、腐敗臭もしくはチーズ様の独特の異臭の発生、ガスの産生と海藻固形成分の液状化、乳酸菌の優占率（%）の低下、pH値の低下が抑制されること等が予備試験で経験されたため、これらの項目に乳酸産生量の測定を加えた項目を指標として発酵を評価することとした。また前節の検討結果からは、スターターの違いにより、発酵産物である単細胞性海藻粒子の生成率には、大きな違いがないことが観察されているため、本実験では発酵状態を把握するための指標からはずした。細菌相の解析手法については、第2章で直接計数法で求めた発酵試料中の全菌数の値が寒天平板法（SMA平板使用）で求めた生菌数の値とほぼ一致したことから、寒天平板法により生菌数を計数し、この寒天平板から分離したコロニーについて分類同定を行うこととした。

発酵条件としては、これまでNaClを添加した系でしか発酵を検討してこなかったが、食品分野等への応用を考えるとNaClを添加しない条件下でも検討を行っておくことが必要となる。本研究では、NaCl添加とNaCl非添加の両条件下での試験区を設定した。NaCl添加条件下での検討においては、*S. thermophilus*を除く10種13菌株が高い乳酸菌率を示したが、接種した乳酸菌種と同一の菌種が高い頻度で優占していることが確認されたのは、*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*, および *L. rhamnosus* を含む7試験区においてであった（Fig. 15）。腐敗臭が感じられる試料が一部の試験区で観察されたが、チーズ臭、ガスの産生、液状化等は観察されなかった。混合接種区の試料も順調な発酵が達成され、*L. brevis*, *L. plantarum* および *L. rhamnosus* が優占した（Fig. 17）ことは、これらの菌種が好適であることを示した単独接種試料での結果を支持した。腐敗臭については、官能的にアミン系の臭気とイオウの臭気との両方が感じられた。アミン系の臭気については、試料の揮発性塩基性窒素

（VBN）濃度を測定して腐敗の指標とすることを第3章で予備的に検討した（データを示さず）が、セルラーゼ投入量に相関して高い値を示し、発酵した試料でも高いVBN値を示すことから、単純に腐敗を示す指標とはならなかった。ただし、アミン系物質の揮発量は、試料のpH値に大きく影響されるため、pH値が低めになる発酵した試料では臭気の発生が抑制され、官能的評価に影響していることが考えられる。イオウ系の臭気は、一般に閾値が低く、定量的評価のためにはガスクロマトグラフィー等の機器分析の導入が必要と考えられた。

NaCl非添加条件下での検討においては、チーズ臭、ガスの産生、液状化等の特徴を示す試料が、しばしば観察され、NaCl非添加の系では発酵が、不安定になる傾向が認められた。NaCl非添加条件下でも、接種した乳酸菌種と同一の菌種が高い頻度で優占していることが確認されたのは、*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*, および *L. rhamnosus* を含む7試験区においてであった（Fig. 16）。混合接種による試験では、*L. plantarum* および *L. rhamnosus* が優占していることが観察され（Fig. 17）、これらの菌種が好適であることが示される一方、*L. brevis* は、NaCl非添加条件下では、*L. plantarum* や *L. rhamnosus* に比べ適性がやや劣ると考えられた。スターターとしての適性が高いとされた、*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei* および *L. rhamnosus* のうち *L. brevis* を除く3種は、ホモ型乳酸菌であり、乳酸生成効率がよく、pH低下作用が高いために良好な静菌効果を示したことが考えられる。一方、同じホモ型乳酸菌でありながら良好な静菌効果を示さなかった *L. zeae*, *L. aciophilus* および *S. thermophilus* は、いわゆる乳系乳酸菌（岡田, 1996）と呼ばれるもので、至適生育温度が30℃～37℃付近と考えられる。例えば *L. aciophilus* は、高温性（thermophilic）で45℃で成育するが、15℃では生育しないとされている（柳田, 1996）。今回の発酵試料の調製は20℃という低めの温度で検討しており、このことが評価結果に影響した可能性が考えられる。なお、乳酸菌スターターを添加した場合、その菌種自体が優占化しない場合でも、他の菌種の乳酸菌が優占することを促進する傾向にあった（Fig 15：8a-12a, 14a；Fig. 16：8b-12b, 14b）。

NaCl非添加の条件下で混入菌の生育が認められると特有のチーズ臭の発生、ガス産生および液状化がおこる。ここでいうチーズ臭とは、酪酸臭に類似した臭気であるが、本研究ではガスクロマトグラフィー等による分析を行っていないので正確なところは明らかでない。チーズ臭の発生、ガス産生および液状化がお

この理由について究明するために、これらの現象が観察された試料から102菌株を分離し、コロニー形状からの類別と、16S rDNA 部分塩基配列に基づく系統解析を行った。その結果、これらの試料には *B. cereus* 類縁菌および *B. sphaericus* 類縁菌が優占して生育していることが明らかとなった。*B. sphaericus* 類縁菌は、7つのクラスターに類別されることが報告されており (Nakamura, 2000)、今回ワカメ試料から分離された *B. sphaericus* 類縁菌の位置を知るため、系統樹は、*B. sphaericus* のクラスターの部分の参照株を充実させて作成した。系統解析の結果、今回ワカメ LS 試料および発酵試料から分離された菌株は、Nakamura (2000) の報告における *B. sphaericus* 第4グループに属する NRS-111株および NRS-800株に最も近く位置し、*B. sphaericus* 標準株である B-23268株 (第3グループ) と別のグループに位置した。一方、*B. cereus* 類縁菌はワカメ原料基質に10~100 CFU/mL 存在し、NaCl 非添加条件下で培養した場合に優占してくるものと考えられた。現在までのところワカメ乾燥粉末試料を食品として利用したことで、*B. cereus* によると思われる食中毒の発生は問題となっていない。これは本菌種の生菌数のレベルが 10^3 CFU/mL 以下と少ないこと、孢子として休眠状態で存在していると考えられること、ワカメ粉末が乾燥状態で保存され、食品として利用される場合も、細菌に生育の機会を与えない条件下で加工されるため等の理由からと考えられる。しかし、発酵処理するなど、細菌に生育の機会を与えてからの利用を考える場合には、食品の安全性を高めるという見地から、分離された *B. cereus* 類縁菌の性状について、今後さらに詳しく調べられる必要がある。特に分離された菌株が毒素株なのか非毒素株なのかを明らかにすることは重要と考えられる。また、*B. cereus* 類縁菌がワカメ製品に混入して存在する理由は、自然生育環境において元々葉体表面に存在していたためなのか、あるいは加工工程で二次的な増殖が起こるためなのか興味を持たれる。*L. brevis* 株はヘテロ発酵型の乳酸菌であるため乳酸発酵の進行に伴い、CO₂を産生していると考えられるが、その産生量が少ないためか、高濃度のワカメ粒子の含む発酵試料においては、ガスの発生は目視によって観察されなかった。したがって本試験で一部の試料についてのみ観察されたガスの発生は、乳酸発酵以外の反応により産生しているものと推察された。試料が顕著に液状化していることを加味して考えると、ワカメの多糖が基質となり、炭酸ガスあるいはメタンガスが発生している可能性が考えられる。ガスの産生および液状化が観察された試料から高頻度で分離された *B. sphaericus* 類

縁菌および *B. cereus* 類縁菌がともに非好塩性の菌種であることは、これらの菌のどちらか或いは両方が、これらの現象に関与していることを示唆した。

最初に開発された野生型コンソーシアム (B5201, Y5201, Y5206) をスターターとして使用して海藻発酵試料を調製した場合、NaCl 非添加条件において、混入菌の生育を十分に抑制できず、発酵産物に好ましくない臭気が付与されたり、*B. cereus* 類縁菌の生育による安全衛生上の問題が存在したりしたが、ホモ型乳酸菌である *L. plantarum*, *L. casei* および *L. rhamnosus* を使用することにより、発酵過程において、これら乳酸菌株が優占し、好ましくない臭気の発生の防止および混入菌の生育の抑制に極めて有効であった。

第5章 海藻発酵素材の応用的価値に関する研究

第1節 水産餌飼料としての検討

農業分野では、藁や雑草を堆肥化して作物栽培の際の土づくりに利用する。畜産分野では、乳酸発酵させ、サイレージとして利用している。これらは、いずれも経済的価値の低い植物素材を発酵処理して食糧生産に結びつける伝統的な技術であり、環境負荷の少ない持続可能な技術といえることができる。一方、水産分野では、発酵技術を利用して、魚介類の生産に結びつけている例は、極めて稀である。水産分野で発酵技術が普及していないことの原因としては、海洋の植物性素材即ち藻類を発酵させる技術が知られていなかったことが考えられる。本研究で開発された海藻の乳酸発酵技術は、初めての海洋の植物性素材を乳酸発酵させる技術であり、今後食料生産の分野で様々なかたちで利用されることが期待される。著者らは、既に海藻組織を海洋細菌の分解能を利用して単細胞化することにより、水産初期餌料としての価値を有するデトライタス粒子を人為的に製造する技術を報告した (Uchida, 1996; Uchida and Numaguchi, 1996)。しかし、この手法で得られる餌料素材は、アルテミア等の懸濁物捕食者に対して飼料効果を有することが証明されているものの (Uchida *et al.*, 1997a; Uchida *et al.*, 1997b)、単細胞化の効率、保存性、安全性の点で改善の余地があり、実用化までに至っていない。一方、今回著者が開発した海藻の発酵技術によれば、これら3つの問題点が改善しているものと期待される。即ち、セルラーゼを使用してワカメ乾燥粉末を基質として発酵処理をした場合、海藻粒子全体の約70% (重量換算) を単細胞性粒子画分 (直径5.8~11.5 μ m) が占める (Uchida and Murata, 2002)。また20°Cで18ヶ

月間保存した後も直径2.9~11.5 μm 画分の粒子濃度が 2.5×10^8 cells/mLのレベルを維持していた(第3章第2節)。安全性についても、乳酸菌、酵母は、病原性を有する種が極めて限られており、従属栄養型の海洋細菌を使用するよりは、安全であると考えられる。一方、水産増養殖の分野では、二枚貝を対象に使用できる大量安定供給できる餌飼料の開発が強く望まれている(Langdon and Siegfried, 1984; Numaguchi and Nell, 1991; Sorgeloos, 1995)。そこで本研究第5章第1節においては、海藻発酵素材の水産餌飼料としての利用の可能性を探るため、ワカメ乾燥粉末を基質として調製した単細胞化・乳酸発酵素材について、アコヤガイ初期稚貝を対象とした飼育試験により、その飼料価値を評価した。

方 法

海藻発酵飼料および生物餌料の調製

第1回目の飼育試験に使用したワカメ発酵試料(MS1)は、本研究第3章第2節の大量調製、保存性試験のところで野生型コンソーシアム(B5201株, Y5201株, Y5206株)をスターターとして10L規模で調製されたものを使用し、20°C下で7ヶ月間保存した段階で使用した。

第2回目の飼育試験に使用したワカメ発酵試料(MS2)は、短時間で調製するため第1回目の飼料の調製法に比べ、海藻濃度条件が1/2、セルラーゼ濃度を5倍として新たに調製して飼料として使用した。即ち、市販ワカメ乾燥粉末(若みどり, 理研ビタミン)20gおよびセルラーゼ(ONOUZUKA R-10, ヤクルト本社)2gを滅菌3.5% (w/v)濃度NaCl水溶液360mLとともに、500mL容のスクリュウキャップ式遠心チューブ(ポリカーボネート製, Nalgene)に入れ、さらに各菌体懸濁液2mLを添加して、スクリュウキャップを閉じた状態でよく振って混合した。菌体懸濁液は、乳酸菌はMRS (Merck)培地で、酵母はYM broth (Difco)で前培養し、滅菌0.85%濃度NaCl水溶液で1回遠心洗浄後、同NaCl水溶液に対して $\text{OD}_{660\text{nm}}=1.0$ の濃度で菌体を懸濁させて調製した。使用した菌体懸濁液は1mL当たり、 5.0×10^8 CFU (B5201株), 5.5×10^5 CFU (Y5201株) 及 1.2×10^7 CFU (Y5206株)の生菌数を含んでいる。菌体接種後、発酵試料は、20°C下8日間、静置培養を行った後冷蔵庫(5°C)に保管した。菌体だけを接種しない試料を対照試料(MS2C)として別に調製し、使用まで冷蔵庫(5°C)に保管した。*Chaetoceros calcitrans*は、改変Erd-Schreiber培地(沼口, 1994)で培養(14h:10h

明暗周期)した対数増殖期後期~定常増殖期初期の新鮮な細胞を餌料として使用した。ワカメ試料(MS1, MS2, MS2C)は、目合63 μm のナイロンメッシュでろ過しながら必要量をアコヤガイ初期稚貝に投与した。

海藻発酵試料の性状評価

海藻発酵試料中の飼料粒子数は、140 μm 径のオリフィスを使用してコールターマルチサイザー(Beckman Coulter, Inc.)で測定した。生菌数のうち従属栄養微生物は、標準寒天培地(日水製薬, SMAと略記)およびマリンアガー2216(Difco, MA)で計数した。乳酸菌は、BCP加プレートカウントアガールで計数した。酵母は、サブロー寒天培地(日水製薬)に、NaClを5%濃度添加した平板培地(SBR5)で計数した。乳酸生成量は、市販キット(FキットD-乳酸/L-乳酸, Roche Diagnostics)を使用して測定した。

アコヤガイの飼育条件

第1回飼育試験では、アコヤガイ初期稚貝(背縁長平均 \pm 標準偏差 $4.59 \pm 0.41\text{mm}$, 25個体を測定して算出)15個体を5L水槽に収容して12日間飼育した。飼育はエアレーションを行いながら実施し、水温27°C, 塩分濃度33~34%であった。給餌は1日1回行い、飼育水は、毎日1回全量を新しい海水(砂ろ過処理)と交換した。ワカメ発酵飼料(マリンサイレージ)投与区として、 3×10^4 cells/mL/日, 1×10^4 cells/mL/日および 3×10^3 cells/mL/日の量で投与した試験区を設定した(それぞれMS1, 1/3MS1, 1/10MS1)。*C. calcitrans*を予備試験の結果で最も成績の良かった 3×10^4 cells/mL/日の条件で投与した試験区をポジティブコントロールとして、また無給餌区をネガティブコントロールとして設定した。

第2回飼育試験では、別の産卵ロットで得たアコヤガイ初期稚貝(背縁長平均4.47~4.95 mm, 各水槽ごとに全15個体を測定して算出)を15個体ずつ水槽に収容し、水温27°C, 塩分濃度32~33%の条件下で、第1回飼育試験と同様に飼育を行った。比較対照区として無給餌区, *C. calcitrans*区(3×10^4 cells/mL/日), 1/10 *Chaetoceros*区(3×10^3 cells/mL/日)を設けた。ワカメ発酵飼料区としては、MS2(2×10^4 cells/mL/日)および2.5MS2(5×10^4 cells/mL/日)を設定した。併用給餌区としてMS2を 2×10^4 cells/mL/日と*Chaetoceros*を 3×10^3 cells/mL/日を給餌した試験区を設定した(MS2 + 1/3 *Chaetoceros*)。ワカメ非発酵試料(MS2C)については、MS2と同様の給餌試験区を設定した(MS2C, 2.5MS2C, MS2C +

1/3 *Chaetoceros*)。第1回飼育試験では、各試験区2水槽、第2回飼育試験では、各試験区1水槽を使用した。

海藻発酵飼料の一般分析

市販ワカメ試料(若みどり, 理研ビタミン)の一般分析を行った。発酵ワカメ試料については、3.5%濃度のNaClを添加して調製してあるため、その乾燥物の一般分析を行ってもNaClが濃縮されて灰分の値が突出して大きくなり、発酵処理による成分変化の傾向を読み取るのが困難であると考え、一般分析を行わなかった。その代りに若みどりの製造工程において水洗浄を徹底して行い塩分含量を極力低減させた低塩規格品である若みどりLSについて発酵の前後で一般分析を行って比較した。粗タンパク質含量はKjeltec Auto 1030 Analyzerで測定した。その他の成分の測定は、定法に従った(科学技術庁調査会, 2002)。炭水化物含量は、全体から粗タンパク質、脂質、灰分の含量を差し引いて表した。LS発酵試料は、若みどりLS 800g, セルラーゼ(ONOUZUKA R-10, ヤクルト本社) 8g, 滅菌蒸留水 8L, 野生型コンソーシアム(B5201, Y5201, Y5206)の菌体懸濁液($OD_{660nm}=1.0$)を各80mLずつ添加し、5°Cで3日間前培養した後、20°C下で11日間培養して調製した。LS発酵試料は、凍結乾燥して分析試料とした。一般分析は、3本試料立てで測定し、平均値で表した。

飼育結果の統計解析

第1回飼育試験の結果の統計学的処理をするにあたり、25個体のデータを基に算出した背縁長平均値を全ての個体の背縁長初期値と仮定して、飼育終了時の背縁長サイズから差し引いて個体成長率を算出した。成長率は、各試験区2水槽の個体成長率データ($n=27\cdot30$)を合わせて平均値 \pm 標準誤差で示した。

第2回飼育試験の結果の統計学的処理をする際には、各試験区の全個体(15個体)の背縁長サイズを飼育試験開始時に測定し、その平均値を飼育終了時の各個体の背縁長サイズから差し引いて1日あたりの個体成長率を算出し、平均値 \pm 標準誤差で示した。各試験区内の個体成長率データの分散の等質性は、Leven testにより試験区間で比較し検定した。各試験区の平均成長率の差の検定は、分散分析により行った。分散分析は、まずKruskal Wallis testを実施して、試験区間に有意な差が存在するかどうか検定し、有意差($P<0.05$)が認められた場合には、さらにGames-Howell testを実施して有意差を有する試験区を検出した。一連の統計検定は、市販統計解析ソフトを使用

して実施した。(SPSS 11.0J, SPSS Inc.)。

結 果

海藻飼料の性状

飼育試験に実施した海藻飼料(MS1, MS2, MS2C)の性状分析の結果をTable 27に示した。MS1, MS2, MS2Cは、単細胞化画分(直径 $2.9\sim 11.5\mu m$)の粒子をそれぞれ 2.6×10^8 /mL, 1.2×10^8 /mL, 1.4×10^8 /mL含んでいた。BCPで計数された乳酸菌数(乳酸菌の%割合)は、 2.2×10^6 CFU/mL ($>98.5\%$), 3.0×10^7 CFU/mL ($>99\%$), $<10^6$ CFU/mLであった。SBRで計数された酵母生菌数(Y5206の%割合)は、 1.4×10^5 CFU/mL ($>97.6\%$), 3.5×10^7 CFU/mL ($>99\%$), $<10^3$ CFU/mLであった。

海藻発酵飼料の飼料効果と適性飼料濃度

Table 28に第1回試料試験の結果を示す。*C. cal-citrans*区(3×10^4 cells/mL/日給餌)では、背縁長成長率 $205\pm 12\mu m$ /日(平均 \pm 標準誤差), 生残率 $96.7\pm 6.6\%$ (平均 \pm 標準誤差)であった。一方、無給餌区では、背縁長成長率 $-26\pm 8\mu m$ /日, 生残率100%であった。MS1区(3×10^4 cells/mL/日), 1/3 MS1区(1×10^4 cells/mL/日)および1/10 MS1区(3×10^3 cells/mL/日)では、それぞれ背縁長成長率が $69\pm 11\mu m$ /日, $-3\pm 8\mu m$ /日および $-13\pm 7\mu m$ /日で、生残率が100%, 90.0%および90.0%であった。MS1の背縁長成長率は、無給餌区の同値に比べ有意に($P<0.05$)高く、飼料効果を示すものであった。検討した給餌濃度の中で、最も成績が良かった給餌条件は、 3×10^4 cells/mL/日であった。

海藻飼料の一般成分

一般成分分析の結果をTable 29に示した。発酵基質として使用したワカメ試料(若みどり)の乾物あたり一般成分は、粗タンパク質含量 $24.1\pm 0.4\%$ (平均 \pm 標準誤差, $n=3$), 粗脂肪 $2.8\pm 0.8\%$, 炭水化物 42.8% , 灰分 $28.4\pm 0.0\%$ であった。若みどり製品より前処理での水洗浄を徹底してある若みどりの低塩規格品(LS)は、粗タンパク質含量 $33.1\pm 1.2\%$, 粗脂肪 $4.8\pm 0.3\%$, 炭水化物 44.4% , 灰分 $16.8\pm 0.0\%$ であった。LS発酵品では、粗タンパク質含量 $34.4\pm 0.1\%$, 粗脂肪 $2.8\pm 0.1\%$, 炭水化物 45.8% , 灰分 $16.2\pm 0.1\%$ で、乳酸発酵処理による一般成分比の大きな変化はなかった。

併用給餌による飼育効果

Table 27. Characteristics of the Undariadiets

Characteristics	MS1* ¹ (Fermented)	MS2 (Fermented)	MS2C (Not fermented)
pH	4.1	4.1	6.4
Particles in a 2.9–11.5 μ m fraction			
Numbers (cells/mL)	2.6 \times 10 ⁸	1.2 \times 10 ⁸	1.4 \times 10 ⁸
(Proportion on volume basis, %)	(93.1)	(95.6)	(92.1)
Microbial counts (CFU/mL) on			
MA* ²	2.5 \times 10 ⁵	NT	NT
BCP* ²	2.2 \times 10 ⁶	3.0 \times 10 ⁷	<10 ⁶
(Lactic acid bacteria, %)	(>98.5)	(>99)	
SBR5* ²	1.4 \times 10 ⁵	3.5 \times 10 ⁷	<10 ³
(Type Y5201, %)	(<2.4)	(<1)	
(Type Y5206, %)	(>97.6)	(>99)	
(Other types, %)	(<2.4)	(<1)	

*¹ Seven months-old MS1 is used as a diet for the first rearing test and the characteristics of the 8 months-old MS1 are shown.

*² Agar plates used for the viable counting were: Marine Agar 2216 (MA), Plate Count Agar with BCP (BCP) and Sabouraud Agar supplied with 5% NaCl (BCP5).

NT:Not tested.

Table 28. Results of feeding trials of MS1 on young pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*

Treatments	Feeding conditions (cells/mL/day)	Hinge length (Mean \pm SD, mm)		Growth rate of hinge length (Mean \pm SE, μ m/day)* ³	Survival (%)
		Initial* ¹	Final (n)* ²		
Unfed	No feed	4.59 \pm 0.41	4.28 \pm 0.52 (30)	-26 \pm 8 ^c	100
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	3 \times 10 ⁴	4.59 \pm 0.41	7.04 \pm 0.78 (29)	205 \pm 12 ^a	96.7
MS1	3 \times 10 ⁴	4.59 \pm 0.41	5.41 \pm 0.49 (30)	69 \pm 11 ^b	100
1/3 MS1	1 \times 10 ⁴	4.59 \pm 0.41	4.44 \pm 0.55 (27)	-3 \pm 8 ^c	90.0
1/10 MS1	3 \times 10 ³	4.59 \pm 0.41	4.55 \pm 0.74 (27)	-13 \pm 7 ^c	90.0

*¹ Mean hinge length obtained from 25 individuals before rearing were used as the initial value of the hinge length for all the individuals.

*² Rearing trials were conducted with replicate tanks (n=15, x2), and the mean values of final hinge length were calculated from the data of 27~30 individuals.

*³ Treatments with different superscripts are significantly different (Games Howell test, P<0.05)

2種類のワカメ試料について飼料効果を第2回飼育試験で評価した。MS2は、ワカメを単細胞化しながら乳酸発酵させた試料であり、MS2Cは、単細胞化処理だけを行い、生菌数が僅少である(BCP計数值: <10⁶CFU/mL)試料である。飼育成績の結果をTable 30に示した。*Chaetoceros*区(3 \times 10⁴ cells/mL/日給餌)および1/10 *Chaetoceros*区(3 \times 10³ cells/mL/日)においては、背縁長成長率(平均 \pm 標準誤差)がそれぞれ168 \pm 33 μ m/日および11 \pm 10 μ m/日、生残率がともに66.7%であった。無給餌対照区の背縁長成長率と生残率は、それぞれ-10 \pm 14 μ m/日、53.3%であった。MS2区(2 \times 10⁴ cells/mL/日)およびMS2C区(2 \times 10⁴ cells/mL/日)では、背縁長成長率がそれぞれ23 \pm 13 μ m/日および18 \pm 16 μ m/日(対照区に対して有意差有り, P<0.05)、生残率がそれぞれ53.3%および66.7%であった。MS2併用給

餌区(MS2 2 \times 10⁴ cells/mL/日 + *C. calcitrans* 3 \times 10³ cells/mL/日)では、背縁長成長率が125 \pm 13 μ m/日、生残率が80.0%で両指標とも改善された。MS2C併用給餌区(MS2C 2 \times 10⁴ cells/mL/日 + *C. calcitrans* 3 \times 10³ cells/mL/日)においても、背縁長成長率が71 \pm 14 μ m/日、生残率が93.3%と飼育成績の改善が認められたが、改善の幅は、MS2試料の場合程顕著ではなかった。MS2およびMS2Cとも給餌量を5 \times 10⁴ cells/mL/日まで増やすと背縁長成長率が47 \pm 17 μ m/日および23 \pm 16 μ m/日で、生残率が66.7%および53.3%となり、飼育成績が上がる傾向が見られたが、併用給餌区のような良好な成績ではなかった。

考 察

Table 29. Proximate analysis of Undariaproducts

Samples	% Crude protein	% Crude lipid	% Carbohydrate	% Ash
Wakamidori before fermentation	24.1 ± 0.4	2.8 ± 0.8	42.8	28.4 ± 0.0
Wakamidori LS before fermentation	33.1 ± 1.2	4.8 ± 0.3	44.4	16.8 ± 0.0
after fermentation	34.4 ± 0.1	2.8 ± 0.1	45.8	16.2 ± 0.1

Carbohydrate is calculated by 100%-(% crude protein+% crude lipid+% ash).
Data is based on triplicate measurements.

Table 30. Results of feeding trials of MS2 and MS2C with young pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*

Treatments	Feeding conditions (cells/mL/day)	Hinge length (Mean±SD, mm)		Growth rate of hinge length (Mean±SE, μm/day)*1	Survival (%)
		Initial (n=15)	Final (n)		
Unfed	No feed	4.65±0.4	4.53±0.49 (8)	-10 ± 14 ^d	53.3
<i>Chaetoceros</i>	3×10 ⁴	4.68±0.51	6.70±1.25 (10)	168 ± 33 ^{ab}	66.7
1/10 <i>Chaetoceros</i>	3×10 ³	4.47±0.47	4.60±0.38 (10)	11 ± 10 ^d	66.7
MS2	2×10 ⁴	4.57±0.46	4.93±0.43 (8)	23 ± 13 ^c	53.3
MS2+1/10 <i>Chaetoceros</i>	2×10 ⁴ (MS2) +3×10 ³ (<i>C. calcitrans</i>)	4.59±0.41	6.15±0.52 (12)	125 ± 13 ^a	80.0
x2.5 MS2	5×10 ⁴	4.95±0.63	5.21±0.64 (10)	47 ± 17 ^{bc}	66.7
MS2C	2×10 ⁴	4.47±0.41	4.86±0.60 (10)	18 ± 16 ^c	66.7
MS2C+1/10 <i>Chaetoceros</i>	2×10 ⁴ (MS2C) +3×10 ³ (<i>C. calcitrans</i>)	4.89±0.60	5.50±0.61 (14)	71 ± 14 ^{abc}	93.3
x2.5 MS2C	5×10 ⁴	4.51±0.43	4.93±0.59 (8)	23 ± 18 ^c	53.3

Results are based on a single rearing trial (n=15).

* Treatments with common superscripts are not significantly different (Games-Howell test, P<0.05)

海藻発酵飼料（以降マリンサイレージと呼ぶ。MSと略記）は大量安定生産できる新飼料素材であり（Uchida and Murata, 2002）、微細藻類の代替品としての利用が期待される。本研究では、MSのアコヤガイ初期稚貝に対する飼料効果を評価することを目的とした。餌飼料素材としての価値を評価する場合、投与した餌料の粒子数、重量或いは粗タンパク質含量等の栄養成分に着目して基準化を行って単位投与量あたりの飼料効果という形で比較するのが一般的であるが、このような比較をする場合には、餌飼料を好適な濃度条件で投与して得られた飼育成績に基づかなければならない。そこで最初にMSの好適投与濃度を知るための試験を行い、 3×10^4 cells/mL/日もしくはそれ以上の濃度での投与が好適と考えられた。第2回目の試験では、 3×10^4 cells/mL/日の他、 5×10^4 cells/mL/日での投与を試験し、背縁長成長率による評価では、 5×10^4 cells/mL/日での投与の方が成績が良かったが、残餌による飼育水の汚れが著しく、飼育水の状態から 3×10^4 cells/mL/日が最適と判断した。MS投与区は無給餌区に比べ有意な成長を示し、飼料効果を有することがまず確認された。単純に背縁長成長率の値だけで比較すると、MS（ 3×10^4 cells/mL/日投与）の飼料効果は、好適な餌料とされる *Chaetoceros*（ 3×10^4 cells/mL/日投与）の34%であった（Table 27）。調製後七ヶ月経過試料および調製直後の試料とともに飼料効果が認められたが、

MSの単独投与では *Chaetoceros* 単独投与区のように高い飼料効果は有していないと考えられた。対照区（無給餌区および *Chaetoceros* 区）で比較すると第2回飼育試験の成績は、第1回飼育試験の成績より全般的に低下している傾向が認められるが、この原因としては、飼育試験を開始するまでの稚貝の前飼育期間が2回目の試験の方が長かったため、稚貝の活性が下がっていた可能性が考えられた。飼料の一般成分を乾重量換算で比較すると、良好な飼料素材とみなされる *C. calcitrans* の成分組成は、粗タンパク質43.0%、粗脂肪13.3%、炭水化物11.7%、灰分31.4%（日清オイリオ、製品資料）である。この値と、本研究におけるMSの成分分析値とを比較すると、MSは、タンパク質のような主要成分よりも脂質成分がまず不足する可能性が示唆された（Table 29）。一方、少量の微細藻を併用給餌することにより、MSの飼料効果は大きく改善されることが2回目の飼育試験で観察された。背延長成長率の値だけで比較すると、併用餌料区（MS 2×10^4 cells/mL/日 + *Chaetoceros* 3×10^3 cells/mL/日投与）の飼料効果は、*Chaetoceros*（ 3×10^4 cells/mL/日投与）の74%であり、生残率では逆に上回っていた（Table 30）。成分分析の結果とあわせて考察すると、少量の微細藻を併用給餌することにより、制限要因になっていた脂質等の栄養成分が供給されて、飼料効果が大きく改善したことが考えられる。一般に *C. calcitrans* をはじめ、飼料効果が高いとされる *Chaetoceros*

餌料の大量安定供給は非常に難しい。したがって、今回の *Chaetoceros* 餌料のうち9割程度を代替しても、*Chaetoceros* 餌料10割供給の飼育成績に近い飼育効果が得られるという観察は非常に注目される。今回の併用給餌による飼料効果の改善の部分は、シングル試験での観察であるため、今後この部分を追試して確かめることが必要である。しかし、同様な併用給餌による飼育効果の顕著な改善は、他の海産餌料生物であるワムシ (Rotifer) を対象にした飼育試験によっても観察しているところである (未発表)。発酵処理をした MS2 と発酵処理をしていない MS2C の飼料効果を比較すると、統計的に有意ではないが全体的に MS2 の方が成績が優れる傾向があった。この理由として飼料中の微生物の存在が関係していることが考えられる。細菌が懸濁物フィーダーであるワムシ (Douillet, 2000) や二枚貝 (Douillet and Langdon, 1994) に対して栄養源として貢献することは既に知られている。また他の研究例では、ある種の微生物の存在が、二枚貝の成育に対して単に栄養源としてではなくプロバイオティックな効果として貢献する可能性を認めている (Riquelme *et al.*, 1997)。従って、本研究においても、発酵スターターとして使用され、飼料中の生菌として存在する乳酸菌や酵母が、アコヤガイ初期稚貝の生育に栄養源等として貢献した可能性が考えられた。MS がプロバイオティクス的な効果を有するかどうかについても今後の研究によりさらに明らかにされていくことが期待される。また MS は、他の海藻を原料基質としても調製が可能である。海藻は、種類によって葉体組織の成分や構造が大きく異なるため、例えば褐藻類と緑藻類とで餌飼料効果も大きく異なる可能性がある。ワカメの場合、アルギン酸多糖が単細胞粒子の表面を被覆しているため、安定である反面、消化吸収が悪い可能性がある。一方、緑藻類のアオサの場合、このような多糖がない形の単細胞性粒子が得られるため、消化吸収がよいことが期待される。今後、アオサを始め他の種類の海藻から調製された MS の餌飼料効果も明らかにされていくことが望まれる。

以上の考察においては、従来型の種苗栽培の現場において現行餌料である微細藻の代替品として集約的な利用を想定して議論を行ってきた。しかし、MS の利用法としては、開放形において全くこれまでと異なる粗放的な利用法を想定することも可能である。近年、内湾域において、アオサの大量繁殖が各地で報告されている。アオサの藻体は、内湾域の窒素等の栄養塩を吸収したものとみなされるのでこれを、MS 化してアサリ等の餌飼料として機能させ、二枚貝類や他の有用水産資源の生産に転嫁することができれば、物質循環

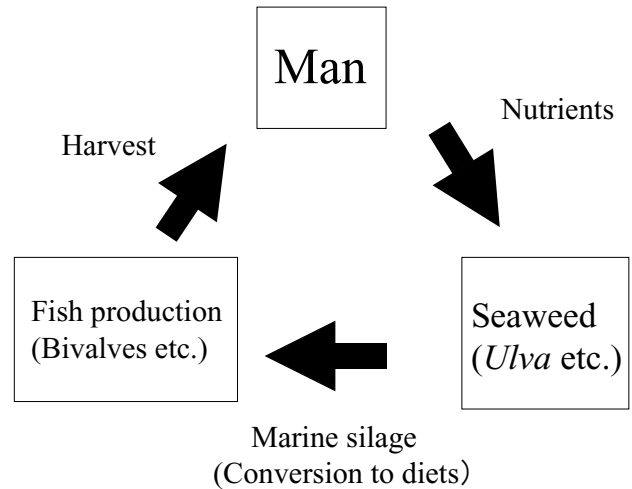


Fig. 19. Concept of sustainable fish production system utilizing a fermentation skill of seaweed.

型の食糧生産システムが構築されることとなる (Fig. 19)。このような MS 化の技術を利用した海藻資源の利用のかたちは、緒言で述べた農業での堆肥技術や畜産業でのサイレージ技術と相通じるものがあり、今後水産分野においても、植物性素材を発酵させて食料生産に結び付けていく技術として確立されていくことが期待される (Uchida, 2003, 内田, 2003)。

第2節 健康機能性食品素材としての検討

日本人が海藻を食する習慣は、古い文献にも見られ、日本人が食する海藻の種類は20以上にものぼる。とりわけワカメ (*Undaria pinnatifida*, Wakame) は、日本人が日常において最も食する頻度の高い海藻の一つである。ワカメは、元来、日本人に健康イメージのある食材であるが、近年ワカメを配合した飼料を給餌させたラットにおいて、脂肪酸酸化系の肝臓酵素が亢進することが報告されており、ワカメが有する健康機能性に関する科学的知見が集積しつつある (Murata *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2002)。ワカメは、生あるいは塩蔵品で流通し、野菜サラダや味噌汁の具として食用に利用されるが、ワカメを発酵処理した類の食材は、これまで市場に見当たらない。

一方、著者らが開発した発酵技術により得られる海藻の乳酸発酵素材は (Uchida and Murata, 2002), Fig. 1において、これまで欠落していた海洋系の植物性基質由来というジャンルの食品素材を提供するものであり、今後、食品分野での利用が大きく期待される。一般に乳酸発酵食品については、その健康機能性について多数の研究がなされており、整腸作用、血中コレステロール低減作用、血圧降下作用、制癌作用、免疫賦活作用等様々な有用機能があることが報告されてい

る(高野ら, 1996)。したがって, 海藻の乳酸発酵素材の食品利用に向けてはその健康機能性を証明していくことが重要と思われる。

海藻発酵産物を食品として利用しようと考えた場合には, 低塩分あるいは塩分を含まない状態の発酵産物であることが好ましい場合も多い。また健康機能性の探索を動物を対象とした食餌試験により実施しようとした場合には, 海藻試料には, 過度の塩分が含有されていないことが求められる。海藻の発酵条件の検討にあたっては, これまで NaCl を 2.5~3.5% 濃度で添加して微生物相を制御し易い条件下で発酵させることが主に検討されており (Uchida and Murata, 2002), 塩分を添加しない条件下での発酵については知見に乏しい。

本研究では, まず野生型コンソーシアムをスターターとして利用して NaCl を添加しない条件下での海藻発酵試料の調製を検討した。次に得られたワカメ発酵素材を 10% (w/w) 配合した飼料をラットに摂食させて, 脂質代謝に及ぼす影響について検証した。

方 法

材 料

ワカメ乾燥粉末は, 市販製品(若みどり LS, 理研ビタミン)を使用した。セルラーゼは, ONOZUKA R-10 (ヤクルト本社)を使用した。スターター微生物は, 中央水産研究所(横浜)に保存されてある *Lactobacillus brevis* B5201 株 (=FRA 000033), *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* Y5201 株 (=FRA 000046), *Candida* sp. Y5206 株 (=FRA 000047) および *Lactobacillus casei* B5406 株 (=FRA 000035) を使用した。パルミトイル-CoA (16:0-CoA), オレイル-CoA (18:1-CoA) は Kawaguchi ら (1981) の方法により調製した。アセチル-CoA は, Sigma 製品 (St. Louis) を使用した。

海藻発酵素材の調製と性状分析

ワカメ発酵試料 (*Wakame-brevis* および *Wakame-casei*) の調製は, まずワカメ乾燥粉末 LS 800g およびセルラーゼ (ONOZUKA R-10) 8g を滅菌蒸留水 8L とともに, 10-L 容のスクリーキャップ式タンク (ポリカーボネート製, Nalgene) に入れて混合した。5℃で一晩放置して, ダマの減少を図った後, スターターとして 3 種類 (*brevis* 群: B5201 株 Y5201 株, Y5206 株 および *casei* 群: B5406 株, Y5201 株, Y5206 株) の菌体懸濁液各 80mL ずつを添加して混合後, 5℃で 3 日間の前培養し, さらに続いて, 20℃で 7 日

間の本培養を行った。本培養時には 1 日一回, 容器を数回上下させて, スクリューキャップを閉じた状態でよく振って発酵試料の均一化を図った。菌体懸濁液は, 乳酸菌を MRS (Merck) 培地で前培養し, 滅菌 0.85% 濃度食塩水で 1 回遠心洗浄後, 同食塩水に対して $OD_{660nm}=1.0$ の濃度で菌体を懸濁させて調製した。菌体懸濁液 1 mL 当たり含有される生菌数は, 7.9×10^8 CFU (B5201 株), 6.4×10^8 CFU (B5406 株), 5.5×10^6 CFU (Y5201 株) 及 8.5×10^7 CFU (Y5206 株) である。発酵終了後, 試料は直接凍結乾燥し, ミキサーで粉碎後, メッシュ 200 を通して配合飼料に使用した。凍結乾燥前の海藻発酵試料について市販キット (F kit D-/L-乳酸, Roche Diagnostics) を使用して乳酸生成量を測定した。また凍結乾燥後の海藻発酵試料について生菌数の測定を行った。生菌数は, BCP 加プレートカウントアガール (日水製薬, BCP) で計数し, 全コロニー数に対する黄色のコロニー数の割合を乳酸菌の割合 (%) とした。酵母は, サブロー寒天培地 (日水製薬, SBR) で計数した。乳酸菌については, BCP 上のコロニーを 20 個無作為に選んで分離し, 第 4 章第 1 節の菌種特異的プライマーセットを使用して PCR 法により, 分離菌中の接種菌と同じ菌種の割合を調べた。

試験動物と試験飼料の調製

オス Sprague-Dawley 系統, 4 週令 (体重 70~80g) のラットを (株) 紀和実験動物研究所 (和歌山) より購入して実験に使用した。ラットは, 個別にステンレス製の網かごに収容され, 空調設備のある部屋 (温度 20℃~22℃, 湿度 55~65%, 照明 7 時から 19 時まで点灯) で, 非精製飼料 (NMF タイプ, オリエンタル酵母) で飼育が行われた。18 日間の慣らし飼育の後, 7 個体ずつ 4 群に分け, 精製基本飼料およびこれにワカメ試料を 10% 含有する試験飼料を給餌した。試験試料は, ワカメ 10% に含有される各種栄養成分に相当する量を基本飼料から差し引いて成分調整をして調製した (Table 31)。差し引かれて減じた部分は, ショ糖添加量で補填した。Wakame 群の成分調整にあたっては, 飼料を配合する時点で, 若みどり LS の成分分析値が不明であったため, 予備試験で調べた別のワカメ粉末試料 (栄養試験用, 理研ビタミン) の分析値 (粗タンパク含量 25.7%, 粗脂肪含量 4.5%, 灰分 11.4%, 繊維 3.4%) を参考として相当分のタンパク質含量をカゼインで, 脂質分をなたね油で調整した。ミネラル組成については, ワカメに含まれるミネラル組成が不明であるため, 成分調整を行わなかった。ワカメ発酵 2 試料 (*Wakame-brevis* および *Wakame-casei*) については,

Table 31. Composition of the experimental diets ^{*1}

Ingredients (/100g diet	Control	Wakame	Wakame- <i>brevi</i> s	Wakame- <i>casei</i>
DL-Methionine ^{*2}	0.3	0.3	0.3	0.3
AIN-76 vitamin mixture ^{*3}	1.0	1.0	1.0	1.0
AIN-76 mineral mixture ^{*3}	3.5	3.5	3.5	3.5
Potato starch ^{*3}	15.0	15.0	15.0	15.0
Wakame (Wakamidori LS) ^{*4}		10.0		
<i>Brevi</i> s-fermented wakame			10.0	
<i>Casei</i> -fermented wakame				10.0
Casein ^{*3}	20.00	17.46	17.36	17.36
Rapeseed oil ^{*5}	5.00	4.55	4.55	4.55
Cellulose ^{*3}	5.00	4.66	4.66	4.66
Sucrose ^{*3}	50.20	43.53	43.63	43.63

^{*1} Abbreviations used: Control, AIN-76 diet; Wakame, AIN-76 diet with wakame; Wakame-*brevi*s, AIN-76 diet with *brevi*s-fermented wakame; Wakame-*casei*, AIN-76 diet with *casei*-fermented wakame.

^{*2} Wako Pure Chemical Industries (Osaka)

^{*3} Oriental Yeast (Tokyo)

^{*4} Riken vitamin (Tokyo)

^{*5} Aiku (Tokyo)

発酵処理により、ワカメ試料の粗タンパク質含量が約1%増大すること (Table 29) を加味して、Wakame区飼料組成からさらに0.1g分のカゼインを減じたものとした。飼育開始時のラットの体重は220±8.7g (平均±標準偏差) であった。実験動物の取り扱いに当たっては、中央水産研究所 (横浜) 実験動物取り扱い倫理規定に添って実施した。

酵素活性の測定

実験終了後、ラットはジエチルエーテルで麻酔され、開腹の後、肝臓組織が手早く取り出された。約3gのラット肝臓組織を7倍量の0.25 mol/L ショ糖液とともにホモジネートし、500xgで10分間遠心処理した。上清を分取し、さらに9000xgで10分間遠心処理し、ミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリア画分を、1 mmol/L EDTA および 3 mmol/L Tris-HCl (pH7.0) を含む0.25mol/L ショ糖液で2回洗浄し、最終的に同ショ糖液に対し、タンパク濃度が20~25g/Lになるよう懸濁した。グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.49) (Kelley and Letzien, 1984), リンゴ酸脱水素酵素 (EC 1.1.1.40) (Hsu and Landy, 1969), 脂肪酸合成酵素 (Kelley *et al.*, 1986) の活性は、肝臓ホモジネートの9000xg遠心上清を試料として測定した (Ide *et al.*, 1992)。

500xg10分間の遠心処理により得られた肝臓ホモジネート上清画分は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (EC 2.3.1.21) およびアシル-CoA脱水素酵素 (EC 1.3.99.3) を除く脂肪酸酸化系酵素の活性測定に使用された。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼおよびアシル-CoA脱水素酵素の活性

は、主にミトコンドリア画分に活性が存在しており (Schulz, 1991), 500xg遠心肝臓ホモジネート上清画分を測定に使用するとブランクが高くなり過ぎるという問題があるため、ミトコンドリア画分試料を使用して酵素活性を測定した。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性は、Ideら (1987) の方法に従い、Triton X-100で可溶化したミトコンドリア画分を試料として測定した。本法によれば、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I の活性のみならず、ミトコンドリア内膜に存在するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II の活性も含んで測定している可能性がある。アシル-CoA脱水素酵素の活性は、フェナジンメソサルフェイト (phenazine methosulfate) を第一電子受容体として使用し、その他の部分は Dommes and Kumnau (1976) および Dommes *et al.* (1981) の方法に従って測定した。アシル-CoAオキシダーゼ (EC 1.3.3.6) 活性は、500xg遠心肝臓ホモジネート上清画分を使用して既報 (Hashimoto *et al.*, 1981; Ide *et al.*, 1987) の方法により測定した。カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ活性測定のための基質としては、16:0-CoA (Kawaguchi *et al.*, 1981) を使用し、アシル-CoA脱水素酵素およびアシル-CoAオキシダーゼの活性測定のための基質には、16:0-CoA, 18:1-CoAを使用した。3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素活性の測定には、アセチル-CoAを使用した。

脂質分析

肝臓および血清脂質は、Folchらの方法 (1957) により抽出し、精製した。抽出されたトリアシルグリ

セロール, コレステロールおよびリン脂質の測定は, 既報 (Hara *et al.*, 1993) の方法に従った。血中の β -ハイドロキシブチレートの測定は, 除タンパク質処理した試料について酵素法により測定した (Ide and Ontko, 1981)。

統計解析

全ての測定データは平均値 (\pm SE) で示した。飼料群間の分散分析は, Duncan の多範囲検定 (Duncan, 1957; Steel and Torrie, 1980) により行った。

結 果

ラット飼育試験の結果

21日間のラット飼育期間において, 1日あたり平均摂餌量および総体重増加量は, 試験群間で有意な差がみられなかった ($P>0.05$, Table 32)。

血清中トリアシルグリセロール値は, *Wakame-brevis* 群が, 対照群より有意に低かった ($P<0.05$, Table 33)。血中コレステロール値は, 試験群間で差がなかった。肝臓中リン脂質は試験群間で差がなかった。肝臓中トリアシルグリセロール値は, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* が, 対照群より有意に低く ($P<0.05$), とりわけ *Wakame-brevis* 群は *Wakame* 群に比べても有意に低かった ($P<0.05$)。肝臓中コレステロール値は, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* が, 対照群より有意に低かった

($P<0.05$)。

脂肪酸酸化関連物質であるアセト酢酸の血清中濃度は, 有意ではないが, *Wakame* 群, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群とも対照群に比べそれぞれ 146%, 180%, 107% と高い値を示した (Table 34)。血清中 β -ハイドロキシブチレート濃度も, 対照群と比べそれぞれ 128%, 132%, 132% と高い値を示した。

肝臓ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の過程で, 脂肪酸物質がミトコンドリア膜を通過する際のキャリアとして機能するカルニチンの量は, 総カルニチン量および遊離カルニチン量の両者としても *Wakame* 群, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群とも対照群に比べ増加していた。

肝臓中の脂肪酸合成酵素活性 (Table 35) は, *Wakame* 群, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群とも対照群より低く, とりわけ *Wakame-casei* 群と対照群との間には, 有意な差があった ($P<0.05$)。リンゴ酸脱水粗酵素活性は, 有意ではないが, *Wakame* 群, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群とも対照群より低い傾向であった。グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は, *Wakame* 群, *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群とも対照群より有意に低く ($P<0.05$), *Wakame-brevis* 群および *Wakame-casei* 群は, *Wakame* 群に比べても有意に低かった ($P<0.05$)。

ペルオキシソームにおける脂肪酸の β 酸化系の律速酵素であるアシル-CoA オキシゲナーゼ活性は, 16:0-CoA および 8:1-CoA を基質として測定した

Table 32. Body weight and food intake of rats fed a control diet or diets containing wakame (*Wakame*) or fermented wakame (*Wakame-brevis*, *Wakame-casei*) *1

	Control	Wakame	<i>Wakame-brevis</i>	<i>Wakame-casei</i>
Body*2, g	414 \pm 11	435 \pm 7	409 \pm 10	409 \pm 13
Food intake*2, (g/21c)	530.2 \pm 21.0	559.8 \pm 9.6	522.2 \pm 18.2	523.9 \pm 24.4

*1 Values are the means \pm SE (n=7)

*2 Mean values of body weight and food intake are not significant among the groups ($P>0.05$, by Duncan's multiple range test).

Table 33. Concentration of lipid components in the serum and liver of rats fed diets containing wakame

	Control	Wakame	<i>Wakame-brevis</i>	<i>Wakame-casei</i>
Serum (mg/ml serum)				
Triacylglycerol	3.06 \pm 0.47 ^a	2.16 \pm 0.17 ^{ab}	1.88 \pm 0.17 ^b	2.33 \pm 0.25 ^{ab}
Cholesterol	1.17 \pm 0.08	1.30 \pm 0.08	1.09 \pm 0.07	1.24 \pm 0.06
Liver (mg/g liver)				
Triacylglycerol	40.3 \pm 6.3 ^a	33.9 \pm 6.8 ^{ab}	17.7 \pm 1.2 ^c	24.7 \pm 3.9 ^{bc}
Cholesterol	2.85 \pm 0.17 ^a	2.47 \pm 0.22 ^{ab}	2.26 \pm 0.14 ^b	2.32 \pm 0.12 ^b
Phospholipid	17.37 \pm 0.96	16.12 \pm 0.15	16.35 \pm 0.58	16.14 \pm 0.72

Values are mean \pm SE, n=7. Different superscripts in a row indicate significant differences ($P<0.05$, by Duncan's multiple range test) among groups.

Table 34. Concentration of compounds related to lipid oxidation in serum and liver of rats

	Control	Wakame	Wakame- <i>brevis</i>	Wakame- <i>casei</i>
In serum (nmol/mL serum)				
Acetoacetate	16.4 ± 4.2	23.9 ± 6.1	29.5 ± 12.5	17.6 ± 3.2
β-hydroxybutyrate	71.4 ± 18.0	91.1 ± 14.8	94.4 ± 11.4	94.0 ± 10.4
In liver (nmol/g liver)				
Total carnitine	9.1 ± 1.7	13.9 ± 2.1	14.6 ± 1.5	15.0 ± 2.5
Free carnitine	8.2 ± 1.1 ^a	11.8 ± 1.4 ^{ab}	12.3 ± 1.5 ^{ab}	12.9 ± 2.2 ^b

*1 Values are the means ± SE, n=7.

*2 Different superscripts in a row indicate significant differences (P<0.05, by Duncan's multiple range test).

Table 35. Activities of enzymes (nmol/min/mg protein) involved in fatty acid oxidation in the livers of rats fed diet containing wakame and fermented wakame products (Wakame-*brevis* and Wakame-*casei*) at 10% w/w^{*1, *2}

Enzyme activities	Control	Wakame	Wakame- <i>brevis</i>	Wakame- <i>casei</i>
Enzymes involved in lipid synthesis (in liver)				
Fatty acid synthetase	12.30 ± 2.93 ^a	6.96 ± 1.62 ^{ab}	6.70 ± 1.35 ^{ab}	5.63 ± 1.38 ^b
Malic enzyme	13.73 ± 3.34	12.81 ± 2.04	12.45 ± 1.32	10.37 ± 1.57
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	108.9 ± 8.5 ^a	81.4 ± 7.1 ^b	43.2 ± 5.4 ^c	52.7 ± 7.0 ^c
Enzymes involved in lipid oxidation (in liver)				
Acyl-CoA oxidase				
Substrate				
16:0-CoA	1.19 ± 0.08	1.46 ± 0.12	1.29 ± 0.05	1.38 ± 0.08
18:1-CoA	1.14 ± 0.08	1.38 ± 0.08	1.28 ± 0.09	1.15 ± 0.15
Acyl-CoA dehydrogenase				
Substrate				
16:0-CoA	35.1 ± 2.0 ^a	28.5 ± 2.3 ^{bc}	25.0 ± 2.3 ^c	33.5 ± 1.8 ^{ab}
18:1-CoA	11.7 ± 2.3	11.0 ± 2.0	9.5 ± 1.1	13.2 ± 1.7
Carnitine palmitoyltransferase	11.8 ± 0.7 ^{ab}	11.7 ± 1.4 ^{ab}	9.2 ± 1.1 ^b	14.0 ± 1.6 ^a
3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	39.9 ± 2.6 ^b	46.9 ± 4.3 ^{ab}	40.4 ± 2.5 ^b	53.1 ± 4.8 ^a

*1 Values are the means ± SE, n=7.

*2 Different superscripts in a row indicate significant differences (P<0.05, by Duncan's multiple range test).

両方の場合で、Wakame 群、Wakame-*brevis* 群および Wakame-*casei* 群とも対照群より、わずかながら高い傾向を示したが、有意な差ではなかった (P>0.05)。

肝臓ミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化系の律速酵素であるアシル Co-A 脱水素酵素の活性は、16:0-CoA を基質として測定した場合に、Wakame 群および Wakame-*brevis* 群で対照群より、有意に低い値を示したが (P<0.05)、18:1-CoA を基質として測定した場合には、試験群間で有意な差は認められなかった。

肝臓ミトコンドリアにおける脂肪酸のβ酸化系に関わる別の酵素で、脂肪酸物質がミトコンドリア膜を通過する際の輸送の速度に影響するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの活性は、Wakame-*brevis* 群で Wakame-*casei* 群より、有意に低い値を示したが (P<0.05)、対照群および Wakame 群とは有意な差ではなかった (P>0.05)。3-ヒドロキシアシル-CoA 脱水素酵素活性は、Wakame-*casei* 群で対照群に比べ有意に高く (P<0.05)、Wakame 群および Wakame-*brevis* 群でも対照群より高い傾向にあった。

海藻飼料の性状

Table 36に飼料の配合に使用したワカメ (Wakame) およびワカメ発酵試料 (Wakame-*brevis* および Wakame-*casei*) の性状分析の結果を示した。発酵処理をしていない Wakame の乳酸含量は、<0.1mg/gであったが、発酵処理により得られた Wakame-*brevis* および Wakame-*casei* の乳酸含量は、発酵直後 (乾燥前) で13.8 mg/g および <0.1mg/g であった。Wakame, Wakame-*brevis* および Wakame-*casei* は、乾燥処理後の段階で乳酸菌 (BCP 上で計数された乳酸菌の%割合) を、それぞれ <10³CFU/mL, 2.7×10⁸CFU/mL (97.5%), 6.4×10⁸CFU/mL (>99%) 含んでいた。酵母の生菌数は、いずれの試料においても検出されなかった (<10³CFU/mL, <10⁴CFU/mL, <10⁴CFU/mL)。Wakame-*brevis* 試料で計数された、生菌のうち97.5%が乳酸菌で、その75% (20株中15株) が *L. brevis* であった。Wakame-*casei* で計数された、生菌のうち >99%が乳酸菌で、その44% (16株中7株) が *L. casei* であった。

考 察

ラット試験において、Murata *et al.* (1999) は、乾燥ワカメを2%以上添加することで、血中および肝臓中のトリアシルグリセロール値が低減することを観察している。ワカメを10%添加した本研究においても、統計的に有意な差ではないものの、同様の傾向を認めた。一方、発酵処理したワカメを食餌させた試験群のうち、Wakame-*brevis* 群については、Wakame 群よりも顕著に血中および肝臓中のトリアシルグリセロール値が低減することを観察しており、とりわけ肝臓中のトリアシルグリセロール値の低減の度合いは、対照群および Wakame 群に対して有意な差であった。Wakame-*casei* 群についても、肝臓中のトリアシルグリセロール値の低減の度合いが、Wakame 群よりも大きい傾向があった。

Murata *et al.* (1999) の報告においては、ワカメ配合飼料の食餌がコレステロール値に対して明確な影響を及ぼすことを観察していないが、本研究においては発酵ワカメを配合した試験群 (Wakame-*brevis* 群、Wakame-*casei* 群) において肝臓コレステロール値の

低減に有意差が認められ、ワカメを発酵処理することでコレステロール低減作用にも影響する可能性が考えられた。

ラットの摂餌量および体重増加量には、試験群間で差がなく、エネルギー消費の違いがトリアシルグリセロールおよびコレステロールの低減作用に関与しているとは考えられなかった。ワカメが、脂質代謝に影響する機構として、ワカメに含まれる食物繊維が脂質化合物の小腸壁からの吸収を物理的に阻害して抑制することが一般にいられているが、本研究に使用したワカメ発酵試料では、炭水化物 (食物繊維) 含量は、非処理のワカメに比べ、減少傾向が少なくとも同レベルと考えられる。またワカメ糖質の発酵の前後での分子量の変化について本研究では測定していないが、Wakame-*brevis* 試料では、発酵の進行に伴って、海藻懸濁液の粘土が急激に低下 (液状化) することを観察しており、糖質の低分子化がおこなっていることが示唆された。したがって、発酵ワカメ試験群 (Wakame-*brevis* 群、Wakame-*casei* 群) で観察された Wakame 群と同等かむしろ高い脂質化合物濃度の低減化作用の現象には、食物繊維による脂質化合物の小腸壁からの

Table 36. Characteristics of wakame (Wakame), brevis-fermented wakame (Wakame-*brevis*) and casei-fermented wakame (Wakame-*casei*)

Characteristics	Wakame	Wakame- <i>brevis</i>	Wakame- <i>casei</i>
Analyzed before freeze-drying			
Lactic acid (mg/g)	<0.1 ^{*1}	13.8	0.1
(L-lactic acid/ D-lactic acid)	(<0.1/<0.1)	(10.0/3.8)	(<0.1/0.1)
Analyzed after freeze-drying			
Proximate analysis (mean±SD, % on dry basis)			
Crude protein	33.1±1.2	39.5±0.5	34.2±0.1
Crude lipid	4.8±0.3	7.7±0.3	7.5±0.3
Ash	17.7±0.2	14.8±0.3	15.5±0.1
Carbohydrate ^{*2}	44.4	38.0	42.8
Microbial counting			
BCP counts (mean±SD, CFU/g) ^{*3}	<10 ³	2.7±0.4 x 10 ⁸	6.4±0.6 x 10 ⁸
Proportion (%) of LAB ^{*4}	—	97.5	>99
Proportion (%) of the clones identical at species level to the starter-used LAB ^{*5}	—	75	44
(Nos. of positive clones / tested clones)		(15/20)	(7/16)
Yeast ^{*6} (CFU/g)	<10 ³	<10 ⁴	<10 ⁴

^{*1} *Undaria* material (Wakamidori LS) was suspended in the same concentration as the two fermented *Undaria* cultures and the lactic acid contained in the supernatant was

^{*2} Carbohydrate% = 100% - (crude protein% + Crude lipid% + Ash%)

^{*3} Lactic acid bacteria (LAB) was counted on Plate Count Agar with BCP.

^{*4} Proportion (%) of lactic acid bacteria was estimated by the numbers of yellow-colored colony against total colony.

^{*5} Proportion of lactic acid bacteria (LAB) was determined by the PCR method using the species-specific primer sets developed in the present study, section 1, Part 4.

^{*6} Counted on Sabouraud agar plate.

吸収の物理的阻害とは別の機構が関与しているものと考えられた。

血清中および肝臓中のトリアシルグリセロールの値は、小腸からの脂質化合物の吸収の他、肝臓における脂質化合物の代謝により影響されると考えられる。従って、ワカメ発酵試料を食餌させたことが肝臓における脂質化合物の代謝即ち、合成速度と分解速度とに影響与えた可能性が考えられる。本研究においては、脂質代謝の合成系に関与する酵素である脂肪酸合成酵素およびグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性が低減されていることを観察し、肝臓における脂質代謝の合成系が抑制されていることが示唆された。一方、脂質代謝の酸化系に関与する酵素であるアシル-CoA オキシダーゼの活性が対照区に比べ、若干高い傾向にあること、血清中の脂質代謝関連物質であるアセト酢酸および β -ヒドロキシブチレートが増加していること、肝臓ミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアにおいて脂質化合物が代謝される際に膜透過のためのキャリアとして機能するカルニチンの増加が観察されており、肝臓における脂質代謝の酸化系も亢進していることが示唆された。

次に、発酵処理ワカメ群において非処理ワカメ群より肝臓の脂質代謝改善作用が顕著に観察された原因が何であるかについて考察するために、非処理ワカメ試料、*brevis*-発酵ワカメ試料および*casei*-発酵ワカメ試料について性状分析を行い比較した。まず、発酵試料を特徴づける物質として、乳酸含量を比較した。非処理ワカメ試料では、乳酸が検出されなかったが(<0.1mg/g)、*brevis*-発酵ワカメ試料では13.8mg/gであり、大きく異なった。しかし一方、*casei*-発酵ワカメ試料では0.1mg/gと低レベルであった。肝臓トリアシルグリセロールの低減作用をはじめ脂質代謝の変化は、*casei*-発酵ワカメ試料でもおこっており、乳酸を主原因物質として説明することは困難であった。次に一般成分組成を比較した。最も大きな成分変化は、炭水化物の減少と粗タンパク含量の増加であった。本研究においては、海藻を発酵させるために、セルラーゼにより海藻の繊維成分であるセルロース類を分解してグルコース等に変換し、これを基質に乳酸発酵をおこしている。したがって原理的に考えて炭水化物の減少は、糖質の減少を反映していると考えられ、粗タンパク含量の増加は、糖質の減少に伴う相対的な変化と理解される。従って、糖質の減少が関与していることが最初に考えられる。炭水化物(糖質)含量の変化が一番大きかったのは、*brevis*-発酵ワカメ試料である。一方、本研究において、トリアシルグリセロール値およびコレステロール値の低減、血清中脂質

代謝関連物質(アセト酢酸および β -ヒドロキシブチレート)の増加、脂質合成関連酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素活性の低下が最も顕著におこったのが、*Wakame-brevis*群であることは、炭水化物(糖質)成分の減少が、肝臓脂質代謝の変化に結びついたとする考えを支持する。一方、炭水化物含量の低下が顕著であった*brevis*-発酵ワカメ試料はその発酵調製過程において、試料が著しく液化化し大量のガスが発生したことが観察された。この液化化とガス化の現象は、炭水化物含量の変化の小さかった*casei*-発酵ワカメ試料においては、はっきりと観察されなかった。このことから*brevis*-発酵ワカメ試料においてはワカメの炭水化物の主成分である多糖の分解と低分子化がおこり、最終的にガス化して失われたことにより、成分組成の大きな変化がおこったと推察された。従って、糖質成分量的減少だけではなく、低分子量化による影響も考慮する必要があると考えられた。次に脂質成分の関与の可能性について考察する。発酵ワカメ試料において粗脂肪含量が増加している傾向が認められる(非処理ワカメ試料4.8%、*brevis*-発酵ワカメ試料7.7%、*casei*-発酵ワカメ試料7.5%)。しかし、別ロットで同様の製法により*brevis*-発酵ワカメ試料を調製し、成分分析を追試したところ、粗タンパク含量39.6%、粗脂肪5.4%、灰分19.8%、炭水化物35.1%となり、粗脂肪の増加は、炭水化物の減少に伴う相対的な変化の範囲内に留まり、総量の変化は、必ずしも観察されなかった。ただし脂肪酸組成等の個別成分の変化がおこっている可能性とその影響については、本研究では検討を行っておらず不明である。ミネラル成分(灰分)については、発酵処理過程において、添加あるいは減じる処理を行っておらず基本的に発酵による変化はないため、関与の可能性は低いと考えられる。なおラット飼料を配合する際、ワカメ試料の粗タンパク含量について実際の分析値33.1%とすべきところを25.7%と見積もって成分調整を行ったため、タンパク成分の量的調整が正確に行われなかったことがあるが、飼料組成全体からみれば、*Wakame*群において対照群より粗タンパク含量水準が0.74%上昇した程度であり、直接の影響を与えた可能性は小さいと考えられる。次にワカメ発酵試料の特徴として乳酸菌の菌体を含んでいることがある。非処理ワカメ試料は、菌体をほとんど含まないが(<10³CFU/g)、*brevis*-発酵ワカメ試料および*casei*-発酵ワカメ試料は、乳酸菌の菌体を生菌として10⁸CFU/g以上含んでおり、菌体の摂取が脂質代謝に影響した可能性が考えられる。しかし、これまで血圧降下作用については乳酸菌*L. casei*の菌体成分が有効であるとの報告があるが、ト

リグリセライドやコレステロールの低減作用に効果があることは我々の知る限り知られていない（高野ら，1996）。本研究において使用した発酵ワカメ試料では，*brevis*-発酵ワカメ試料において，非乳酸菌の混入がBCP平板上で2.5%レベルで認められており，また乳酸菌コロニーの25%（20株中5株）が*L. brevis*以外の乳酸菌であるなど複数の菌種が混入しているという問題がある。*casei*-発酵ワカメ試料についても乾燥処理後の試料では，非乳酸菌が検出されていないものの，乳酸含量が0.1mg/gと極端に低いことから，乾燥処理前の培養段階で例えば酢酸菌等の非乳酸菌の生育がおこり菌相の一部を占めたことが疑われ，また，菌種レベルでも*L. casei*の割合は44%（16株中7株）に留まっている。したがって，乳酸菌菌体の影響について議論をすすめるには，混入菌の生育を認めないより菌相的に純粋な乳酸発酵試料を調製して，ラットに食餌させ，脂質代謝改善作用が認められるかどうか調べる必要があると考えられた。

本研究においては，発酵処理ワカメ食餌群において，非処理ワカメ食餌群よりも顕著な脂質代謝改善作用を認め，発酵ワカメ素材が，健康機能が期待できる魅力ある新しい食品素材であることが示された。今後，健康機能が強化される原因の究明には，*L. plantarum*あるいは*L. casei*のようなホモ型乳酸菌を単独でスターターとして使用するなどにより，菌相制御が難しいNaCl非添加条件下において，菌相的に純粋で品質の安定した発酵試料を調製して動物試験の追試を行い，解析を進めていく必要があると考えられた。

第6章 総括

海洋生物資源の食糧・食品としての利用は，これまで主に捕獲（漁獲）によりなされてきたといえるが，今後は栽培増養殖，加工等の人為的工夫が加えられ，より高度な利用がなされていくものと考えられる。発酵技術は，長い歴史の中で人類が生み出した偉大な発明であり，食糧生産，食品加工にかかわる分野で人類社会に多大な貢献をしている。しかし，これら食糧・食品分野における発酵技術は，主に陸上生物素材を基質として実践されており，海洋の生物素材を基質とした例は極めて限られており，とりわけ植物性素材（藻類）を基質とした発酵技術は，皆無に等しい。

著者は，海洋起源の試料から乳酸菌・酵母を分離し，これを糖化酵素と組み合わせて使用することで，海藻を乳酸発酵させる技術を開発した。さらに，海藻を単細胞化する技術と組み合わせて，海藻を微粒子発酵素材に変換する技術を開発した。海藻の乳酸発酵技

術をさらに深化させるため，発酵試料中の微生物相をPCR法により，種レベルで検出する方法を開発し，この方法を利用することで海藻の発酵スターターとして好適な微生物の組み合わせと菌種を明らかにした。最後に，得られた海藻発酵素材を利用した種々の産業利用の可能性について検討した。得られた成果の概要を述べる。

- 1) 発酵状態にある海藻（アオサ，*Ulva* spp.）試料の微生物相を調べ，乳酸菌 *Lactobacillus brevis* と2種類の酵母 *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* および *Candida zeylanoides* が優占していることを明らかにした。これら3種類の分離株を糖化酵素（セルラーゼ）とともにスターターとして接種する方法で，紅藻類，褐藻類，緑藻類，顕花植物を含む海藻草類一般を乳酸・エタノール発酵させることができることを見出した。
- 2) 分解の容易なワカメ（*Undaria pinnatifida*）を基質に使用することで，海藻葉体を高い効率で単細胞化しながら乳酸発酵させる技術を開発した。
- 3) 海藻発酵試料中の微生物相をPCR法を用いて菌種レベルで迅速同定できる技術を開発した。いろいろな菌種の組み合わせのスターターをワカメに接種し，上記手法を用いて解析した結果，乳酸菌の単独使用でも発酵スターターとして機能すること，とりわけホモ型乳酸菌の使用が，雑菌の成育を抑制する上で有効であることを明らかにした。
- 4) 海藻を単細胞化・乳酸発酵させて得た素材は，直径が約10 μ mであり，大量安定供給が困難な微細藻類の代替餌料としての利用が考えられる。ワカメから調製した海藻発酵飼料（MS2）についてアコヤ貝初期稚貝に対する飼料効果を実証した。少量の微細藻類との併用給餌により，飼料効果が飛躍的に高まる点が注目された。
- 5) 海藻発酵素材に脂質代謝改善作用があることをラット試験により観察した。肝臓酵素の測定からグルコース-6-リン酸脱水素酵素の活性が有意に低下するなど脂肪酸合成系の代謝が抑制される一方，脂肪酸-CoAのミトコンドリア膜の通過のキャリアであるカルニチン量が有意に増加するなど脂肪酸酸化系の代謝亢進が示唆された。海藻発酵産物が健康機能が期待できる新しい食品素材であることを示した。

以上の研究により，海藻草類一般を乳酸発酵させるための手法が開発され，スターターとしての使用に適した微生物を明らかにした。今後さらに検討されることにより，海藻の乳酸発酵素材が餌飼料，食品素材等多方面において利用されていくことが期待される。今

後の問題点としては、低塩分の不安定な条件下においてはしばしば、発泡と異臭を特徴とする変敗現象が起こるが、この変敗の機構について、*Bacillus cereus* 近縁種が関与している可能性があり、海藻発酵産物の安全性の確保の観点から、今後、詳しく検討されていくべきであろう。一方、この変敗による発泡がおこると、海藻発酵産物が高タンパク素材に変化するため、逆に海藻資源の高度利用の観点からも注目される。*Bacillus* 属細菌の分解能を取り入れた分解・発酵技術の開発、メタン発酵を取り入れた高タンパク化発酵技術等が開発され、今後、海藻の発酵技術のバリエーションが増えることにより、海洋系植物性基質発酵産業という分野で新産業が創出されることが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご理解を頂き、良い研究環境を与えて下さった中央水産研究所利用化学部池田和夫部長（現水産総合研究センター本部研究調査部研究交流課長）、良い研究環境を与えて下さるとともに健康機能性試験についてご指導下さった同部応用微生物研究室村田昌一室長に深甚なる謝意を表します。また、二枚貝に対する飼育試験に関してご協力とご指導を頂きました[※]元中央水産研究所沼口勝之博士に感謝と哀悼の意を捧げます。

本研究の推進にご理解を頂き、乳酸菌株の提供等ご協力とご助言を頂きました株式会社ヤクルト本社中央研究所石川文保博士、ヤクルト薬品工業株式会社坂田博行氏、実験にご協力を頂きました株式会社グレース里見理子氏にお礼申し上げます。

研究全般に対してご指導ならびにご鞭撻を頂きました京都大学大学院内田有恒教授、同左子芳彦助教授、福山大学工学部石田祐三郎教授、京都大学名誉教授門田元博士、水産大学校食品生産学科芝恒男教授、前田俊道講師に深く感謝致します。

アオサの酵素分解に関して、ご助言を頂き、また実験にご協力頂きました長崎大学藤田雄二教授、酵素実験に関してご助言を頂きました三重大学荒木利芳教授、研究にご理解を頂き、情報発信の機会を与えて下さった東京海洋大学 能登谷正浩教授、酵母の同定試験に関してご指導頂きました理化学研究所中瀬崇博士並びに鈴木基文博士に深く感謝致します。また海藻発酵試料の応用的価値に関する知見を深めて下さることにご協力頂いた岩手県水産技術センター阿部孝弘研究員、株式会社ジャパンアクアテック[※]小倉理一元取締役社長、吉田満彦氏に感謝致します。

最後に、本研究を行う際、ご助力を頂いた佐藤洋子

氏、甘粕英子氏、青木淳氏、中央水産研究所佐野陽子氏、株式会社共和テクノス浅野久志氏、ご助言を頂いた中央水産研究所里見正隆博士、瀬戸内海区水産研究所寺脇利信博士に心から感謝致します。

本研究は、農林水産技術会議事務局からパイオニア特別研究課題（H12-14, Grant No. PRPF1204）として資金援助をして頂きました。関係者の方々に御礼申し上げます。

参考文献

- 新崎盛敏, 新崎輝子, 1978: 海藻のはなし. 東海大学出版会, 東京, 228pp.
- Barnett J. A., Payne R. W., and Yarrow D., 1990: Yeasts: Characteristics and identification, 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1150pp.
- Cuomo V., Perretti I., Verde A., and Cuomo A., 1995: Utilization of *Ulva rigida* biomass in the Venice lagoon (Italy) : biotransformation in compost. *J. Appl. Phycol.*, **7**, 479-485.
- Daws C. J., 1981: Marine Botany, John Wiley & Sons, Washington, 628pp.
- Dommes V., and Kumnau W. H., 1976: A convenient assay for acyl-CoA dehydrogenase. *Anal. Biochem.*, **71**, 571-578.
- Dommes V., Baumgart C., and Kumnau W. H., 1981: Degradation of unsaturated fatty acids in peroxisomes. Existence of 2, 4-dienoyl-CoA reductase pathway. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8259-8262.
- Douillet P. A., 2000: Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions. 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture*, **182**, 241-248.
- Douillet P. A., and Langdon C. J., 1994: Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) . *Aquaculture*, **119**, 25-40.
- Duncan D. B., 1957: Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics*, **13**, 164-176.
- Fell J. W., Ahearn D. G., Meyers S. P., and Roth E. J., 1960: Isolation of yeasts from Biscayne Bay Florida and adjacent benthic areas. *Limnol. Oceanogr.*, **5**, 336-371.
- Filho-lima J. V., Vieira E. C., and Nicoli J. R., 2000: Antagonisticeffect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli*

- combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 1365-370.
- Folch J., Lee M., and Sloane-Stamley G. H., 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 467-509.
- Franzmann P. D., Hopfl P., Weiss N., and Tindall B. J., 1991: Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. *Arch. Microbiol.*, **156**, 255-262.
- Gatesoupe F. J., 1999: The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, **180**, 147-165.
- Gunaseelan V. N., 1997: Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass and Bioenergy*, **13**, 83-114.
- Hara K., Onizawa K., Honda H., Otsuji K., Ide T., and Murata M., 1993: Dietary diacylglycerol-dependent reduction in serum triacylglycerol concentration in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **37**, 185-191.
- Hashimoto T., Miyazawa S., Gunarso D., and Furuta S., 1981: α -Amanitin inhibits the oxidation of long-dependent reduction in serum triacylglycerol concentration in rats. *J. Biochem.*, **90**, 415-421.
- Hsu R. Y., and Landy H. A., 1969: Malic enzyme. *Meth. Enzymol.*, **13**, 185-191.
- 一島英治, 1997: 発酵食品への招待, 裳華房, 東京, 156pp.
- Ide T., and Ontko J. A., 1981: Increased secretion of very low density lipoprotein triglyceride following inhibition of long chain fatty acid oxidation in isolated rat liver. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10247-10255.
- Ide T., Watanabe M., Sugano M., and Yamamoto I., 1987: Activities of liver mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation enzymes in rats fed trans fat. *Lipids*, **22**, 6-10.
- Ide T., Hirabayashi S., Kano S., and Sugano M., 1992: Soybean phospholipid dependent reductions in triacylglycerol concentration and synthesis in the liver of fasted-refed rats. *Biochem. Biophys. Acta*, **1124**, 163-170.
- Ishige N., 1993: Cultural aspect of fermented fish products in Asia, in "Fish fermentation technology" (ed. by Lee C, Steinklaus K. H. and Reilly P. J. A.) , United Nations University Press, Tokyo, pp. 13-32.
- Ishikawa M., Nakajima K., Yanagi M., Yamamoto Y., and Yamasato K., 2003: *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **53**, 711-720.
- 石谷孝佑, 1995: 魚醤文化フォーラム in 酒田, 幸書房, 東京, 85pp.
- 科学技術庁資源調査会, 2002: 五訂食品標準成分表, 女子栄養大学出版部, 東京, 464pp.
- Kawaguchi A., Yoshimura T., and Okuda S., 1981: A new method for the preparation of acyl-CoA thioesters. *J. Biochem.*, **89**, 337-339.
- 河合章, 杉田治男, 出口吉昭, 1988: 水族環境学実験, 恒星社厚生閣, 東京, 160pp.
- Kelly D. S., and Klezien R. F., 1984: Ethanol modulation of hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **217**, 543-549.
- Kelley D. S., Nelson G. J., and Hunt J. E., 1986: Effect of prior nutritional states on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochemistry*, **91**, 533-544.
- Kimura M., 1980: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.*, **16**, 111-120.
- 小玉健太郎, 2003: 海洋酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分離と発酵食品製造への利用. 月刊海洋, **35**, 262-265.
- Langdon C. J. and Siegfrie C. A., 1984: Progress in the development of artificial diets for bivalve filter feeders. *Aquaculture*, **39**, 135-153.
- Mann. K. H., 1973: Seaweeds: their productivity and strategy for growth. *Science*, **182**, 975-981.
- Matsuki T., Watanabe K., Tanaka R., Fukuda M., and Oyaizu H., 1999: Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4506-4512.
- McClary D. O., Nulty W. L., and Miller G. R., 1959:

- Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, **78**, 362-368.
- Murata M., Ishihara K. and Saito H., 1999: Hepatic fatty acid oxidation enzyme activities are stimulated in rats fed the brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (Wakame). *J. Nutr.*, **129**, 146-151.
- Murata M., Sano Y., Ishihara K., and Uchida M., 2002: Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J. Nutr.*, **132**, 742-747.
- Nakamura L. K., 2000: Phylogeny of *Bacillus sphaericus*-like organisms. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **50**, 1715-1722.
- Nakase T. M., Suzuki M., Phaff H. J., and Kurtzman C. P., 1998: *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. in: "The Yeasts, A Taxonomic Study 4th ed." (ed. by Kurtzman C. P. and Fell J. W.), Elsevier, Amsterdam, pp. 157-173.
- 西澤一俊, 1989: 海藻学入門, 講談社学術文庫, 東京, 202pp.
- 沼口勝之, 1994: アコヤガイ (母貝と初期稚貝) の餌料環境と摂餌に関する研究. 長崎大学博士学位審査論文. 219pp.
- Numaguchi K. and Nell J. A., 1991: Effect of gelatin-acacia microcapsule and algal meal supplementation of algal diets on growth rates of Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley), larvae. *Aquaculture*, **94**, 65-78.
- 大野正夫, 1996: 21世紀の海藻資源—生態機構と利用の可能性, 緑書房, 東京, 260pp.
- 岡田早苗, 1996: 生育環境による分布乳酸菌の差異, 「乳酸菌の科学と技術」(乳酸菌研究集団談会編), 学会出版センター, 東京, pp. 13-16.
- 岡内正典, 1988: *Tetraselmis tetrathele* (West, G. S.) Butcher の大量培養に関する研究. 養殖研究報告, **14**, 1-123.
- Porter K. G. and Feig Y. S., 1980: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- Rengpipat S., Rukpratanporn S., Piyatiratitivorakul S., and Menasaveta P., 2000: Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, **191**, 271-288.
- Ringo E. and Gatesoupe F. J., 1998: Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, **160**, 177-203.
- Riquelme C., Araya R., Vergara N., Rojas A., Guaita M., and Candia M., 1997: Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, **154**, 17-26.
- Saitou N. and Nei M., 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- 瀬古慶子, 1984: *Pavlova lutheri* の培養における通気量の影響について. 昭和58年度三重県栽培漁業センター事業報告, pp. 65-68.
- Schulz H., 1991: Beta oxidation of fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1081**, 109-120.
- Shiba T., Hill R. T., Straube W. L., and Colwell R. R., 1995: Decrease in culturability of *Vibrio cholerae* caused by glucose. *Appl. Env. Microbiol.*, **61**, 2583-2588.
- 清水 潮, 1985a: 培養係数法, 「海洋微生物研究法」(門田元, 多賀信夫編), 学会出版センター, 東京, pp. 41-52.
- 清水 潮, 1985b: 海洋細菌の同定, 「海洋微生物研究法」(門田元, 多賀信夫編), 学会出版センター, 東京, pp. 228-233.
- Sivalingam P. M., 1982: Biofuel-gas production from marine algae. *Jap. J. Phycol.*, **30**, 207-212.
- Smith S. V., 1981: Marine macrophyte as a global carbon sink. *Science*, **211**, 838-840.
- Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., and Holt J. G., 1989: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Williams & Wilkins, Baltimore, 1599pp.
- Song Y., Kato N., Liu C., Matsumiya Y., Kato H., and Watanabe K., 2000: Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **187**, 167-173.
- Sorgeloos P., 1995: Bioengineering of hatcheries for marine fish and shellfish. *J. Mar. Biotechnol.*, **3**, 42-45.
- SPSS Inc., 2001: SPSS Base 11.0J User's Guide, SPSS Inc., Illinois, 509pp.
- Steel R. G. D. and Torrie J. H., 1980: Principles and procedures of statistics, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 200pp.
- Steinkraus K. H., 1993: Comparison of fermented food of East and West, in "Fish fermentation

- technology" (ed. by Lee C., Steinklaus K. H. and Reilly P. J. A.), United Nations University Press, Tokyo, pp. 1-12.
- Suehiro S. and Tomiyasu Y., 1962: Studies on the marine yeasts. VII On the utilization of plankton and seaweeds by yeasts. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **13**, 227-235.
- 鈴木健一郎, 1996: 分類体系と分子系統, 「乳酸菌の科学と技術」(乳酸菌研究集団談会編), 学会出版センター, 東京, pp. 24-37.
- Suzuki M. and Nakase T., 1999: A phylogenetic study of ubiquinone Q-8 species of the genera *Candida*, *Pichia*, and *Citeromyces* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**, 239-246.
- Suzuki M., Suh S., Sugita T., and Nakase T., 1999: A phylogenetic study on galactose-containing *Candida* species based on 18S ribosomal DNA sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**, 229-238.
- 高野俊明, 中村康則, 横倉輝男, 1996: 栄養生理機能, 「乳酸菌の科学と技術」(乳酸菌研究集談会編), 学会出版センター, 東京, pp. 311-341.
- Tankskanen E. I. D., Tulloch A. J., Hillier A. J., and Davidson B. E., 1990: Pulsed-field gel electrophoresis of Sma I digests of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 280-286.
- Tatsuzawa H. and Takizawa E., 1995: Changes in fatty acid composition of *Pavlova lutheri* (Prymnesiophyceae) affected by culturing conditions. *Fish. Sci.*, **61**, 363-364.
- Taysi I. and Uden N., 1964: Occurrence and population densities of yeast species in an estuarine-marine area. *Limnol. Oceanogr.*, **9**, 42-45.
- テルモ株式会社, 1991: 海藻食品およびその製造方法. 公開特許公報(日本国特許庁), 特開平4-258273.
- Thompson J. D., Higgins D. G., and Gibson T. J., 1994: Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- 鳥羽光晴, 深山義文, 1993: イソクリシス・タヒチ株の大量培養 I 好適培養条件, 栽培技研, **21**, 45-53.
- 徳田廣, 大野正夫, 小河久朗, 1987: 海藻資源養殖学, 緑書房, 東京, 354pp.
- Tynkkyinen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., and Saxelin M., 1999: Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulse-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, **65**, 3908-3914.
- Uchida M. and Nakayama A., 1993: Isolation of *Laminaria*-frond decomposing bacteria from Japanese coastal waters. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1865-1871.
- Uchida M., Nakayama A., and Shinnichiro A., 1995: Distribution and characterization of bacteria capable of decomposing brown algae fronds in waters associated with *Laminaria* vegetation. *Fish. Sci.*, **61**, 117-120.
- Uchida M., 1996: Formation of single cell detritus densely covered with bacteria during experimental degradation of *Laminaria japonica* thalli. *Fish. Sci.*, **62**, 731-736.
- Uchida M. and Numaguchi K., 1996: Formation of protoplasmic detritus with characteristics favorable as food for secondary animals during microbial decomposition of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) frond. *J. Mar. Biotechnol.*, **14**, 200-206.
- Uchida M., Nakata K., and Maeda M., 1997a: Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, **154**, 125-137.
- Uchida M., Nakata K., and Maeda M., 1997b: Conversion of *Ulva* fronds to a hatchery diet for *Artemia* nauplii utilizing the degrading and attaching abilities of *Pseudoalteromonas espejiana*. *J. Appl. Phycol.*, **9**, 541-549.
- Uchida M., 1999: Microbial conversion of macroalgae into a detrital hatchery diet. *JARQ*, **33**, 295-301.
- 内田基晴, 2002: 海藻の発酵について, 日本乳酸菌学会誌, **13**, 92-113.
- Uchida M., Maeda Y., and Shiba T., 2002: Phylogenetic analysis of three marine bacteria that have an ability to decompose *Laminaria japonica*. *Fish. Sci.*, **68**, 703-705.
- Uchida M. and Murata M., 2002: Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, **207**, 345-357.

- Uchida M., 2003: Use of fermented seaweed as a hatchery diet. *Aquafeed*, **6**, 15-17.
- 内田基晴, 2003: 海藻の乳酸発酵. 月刊海洋, **35**, 270-279.
- Uchida M., Numaguchi K., and Murata M., 2004a: Mass preparation of marine silage from *Undaria pinnatifida*, and its dietary effect for young pearl oysters. *Fish. Sci.*, **70**, 457-463.
- Uchida M., Amakasu H., Satoh Y., and Murata M., 2004b: Combinations of lactic acid bacteria and yeast suitable for preparation of marine silage. *Fish. Sci.*, **70**, 508-518.
- 内田基晴, 佐藤洋子, 村田昌一, 松嶋良次, 2004: 水産生物遺伝資源保存事業海洋微生物部門ベースコレクションの生物性状. 水研センター研報, **11**, 19-30.
- Uden N. V. and Branco R. C., 1963: Distribution and population densities of yeast species in Pacific water, air, animals, and kelp off southern California. *Limnol. Oceanogr.*, **8**, 323-329.
- Urano N., Hirai H., Ishida M., and Kimura S., 1998: Characterization of ethanol-producing marine yeasts isolated from coastal water. *Fish. Sci.*, **64**, 633-637.
- Walter J., Tannock G. W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D. M., Munro K., and Alatossava T., 2000: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 297-303.
- Walter J., Hertel C., Tannock G. W., Lis C. M., Munro K., and Hammes W. P., 2001: Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2578-2585.
- Wang R., Cao W., and Cerniglia C. E., 1996: PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1242-1247.
- 渡辺幸一, 三宅妙子, 松木隆広, 小柳津広志, 1998: 16S rRNA の塩基配列を利用した発酵乳製品中の *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属の菌種同定, 「腸内フローラの分子生態学」(光岡知足編), 学会出版センター, 東京, pp. 129-154.
- Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., and Lane D. J., 1991: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- Welsh J. and McClelland M., 1990: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
- Wickerham L. J., 1946: A critical valuation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. *J. Bacteriol.*, **52**, 293-301.
- Wickerham L. J., 1951: Taxonomy of yeasts. Techn. Bull., 1029, U. S. Dept. Agr., Washington, D. C.
- 柳田藤寿, 1996: 分離・培養・保存・同定法, 「乳酸菌の科学と技術」(乳酸菌研究集団談会編), 学会出版センター, 東京, pp. 16-24.
- Yarrow D., 1998: Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts, in: "The Yeasts, A Taxonomic Study 4th ed." (ed. by Kurtzman C. P. and Fell J. W.), Elsevier, Amsterdam, pp. 77-100.