総 説

海藻の発酵について

内田基晴[†]

(独) 水産総合研究センター 中央水産研究所
〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4

1. はじめに

発酵には、食品、飼料、肥料の生産等、食糧生産に関わるものとメタン生産等、エネルギー生産に関わるものがある。海藻の発酵といえば、エネルギー生産を目的としたメタン発酵に関する研究が、1970年代に米国において、また少し遅れて1980年代に日本においておこなわれた経緯があるが、いずれもコスト的要素がネックとなり実用化には至っていない¹⁾。一方、食糧生産の分野における海藻の発酵に関する研究は、これまで皆無であったといってよい。これは海藻を発酵させる技術そのものが知られていなかったためにほかならない。発酵に使用される基質を陸上由来か海洋由来かという観点から分類し、さらにそれが動物性か植物性かに分けて眺めると、海藻即ち海洋由来の植物性素材を発酵させる技術は、これまでポッカリ穴の空いた空白領域であったことに気づく。

本稿では、食糧生産に関わる発酵の分野で、最近著者らによって開発された海藻の乳酸発酵技術に関する知見と今後の産業利用の可能性についてまとめる。なお、海藻の乳酸発酵に関する研究は、ごく最近の話題であり、国内の海藻発酵産業の創出に少しでも早く貢献できればとの思いから、本稿にまとめられたデータのかなりが投稿準備中のものを含んでいることをご容赦願いたい。

2. 海藻発酵技術が誕生した背景

海藻を発酵させる技術とそれに使用される微生物は、偶然の幸運から得られた。それまで著者らは海藻を単細胞化し、水産初期餌料（稚魚や幼生のえさ）として利用しようという目的をもって海藻の分解を試みていた。通常水産初期餌料として使用される微細藻類は、培養に努

力がかかりまた不安定な要素があるため、海藻がその代替品として使用できれば好都合であるからだ。当初、強力な海藻分解活性を有する好気性の海洋細菌を、直接、海藻葉体に作用させて単細胞性の海藻デトライタス（デトライタスは遺骸、糞等の生物起源の分解残骸の総称）にまで分解し、これを餌として使用することを検討した。この研究により、海藻を単細胞化すれば初期餌料としてある程度機能することが実証され^{2,3)}、一定の可能性を見出したが、一方、実用化に向けて3つの問題点が抽出された。まずバッチ式培養下の細菌による直接分解方式では単細胞レベルまで分解されるのは海藻組織のごく一部であるという分解効率の低さ、次に餌料価値を有する単細胞性粒子の数が保存中に（おそらく細菌に消費されて）減耗するという保存性の問題、さらに環境中に放出された場合に養殖ノリ等の有用海藻類にネガティブな影響をおこさないかという安全性の問題である。これらの問題点に直面し、どちらかといえば腐敗系の菌種といえる好気性の細菌を使用するのではなく、いわゆる発酵系の菌種を使用することにより、少なくとも保存性と安全性の問題は改善されるのではないかという考えを持ち始めた。一方、一番めの問題の分解効率の点からいえば市販酵素を使用すればコストはかかるが、プロトプラストあるいはスフェロプラストと呼ばれる単細胞性の海藻粒子が比較的高い効率で得られることが既に知られていた。そこで海藻粒子の単細胞化は、市販酵素を利用して達成し、微生物を利用して発酵させる方法を考案した。以下にその技術の概略を述べる。

3. 海藻発酵の技術面

(1) 海藻を発酵させる微生物の分離

アオサ (*Ulva* sp.) をアワビアセトンパウダーとセルラーゼで処理すると、単細胞性の粒子が高収率で得られる。著者らは、このように酵素処理してアオサの単細胞性粒子を調製し、その飼料効果を調べる実験をおこなっ

[†]To whom correspondence should be addressed.

Phone : +81-45-788-7661

Fax : +81-45-788-5001

E-mail : uchida@affrc.go.jp

ていたが、その余り試料を冷蔵庫（2℃）に1年半にわたり放置した際、そのアオサ試料が、エステル様の芳香を有する状態になっていることを偶然、観察した。顕微鏡でこの試料を観察すると桿菌に混じり、酵母・糸状菌様微生物が観察され、微生物が関与する発酵らしき現象がおきているものと推察された。この発酵試料を、セルラーゼ処理した新たなアオサ藻体試料に植え継ぎ、培養すると、芳香を伴う発酵現象が再現されることが確認された。さらにその後1年にわたりこの発酵“元種”を継体する過程で、セルラーゼ、NaCl、元種の3要素を添加して培養すれば、発酵スターターとしての機能を維持しながら試料を長期間安定に継体できることがわかった（表1）。使用したセルラーゼ（ヤクルト薬品工業、オノズカR-10）は、セルラーゼ活性以外の糖質分解酵素活性も保有していて、藻体の分解に関与していると考えられるが、海藻試料に添加するとグルコースが生成してくることが観察され、発酵の基質となる糖を供給する役目も果たしていると考えられた。一方、NaClを添加しなくても芳香臭の発生がおこる場合があることから、NaClの添加は必ずしも発酵に必須ではないと考えられたが、一般的な食品発酵の事例から考えて、非好塩性の腐敗細菌の生育抑制の意味から有利であろうという考えの下、添加することを基本とした。この他、海藻は生ではなく冷凍ストックしたものや乾燥物でも基質として使

用できること、他の種類の海藻（例えばマコンブ）試料に植え継いだ場合でも発酵を誘起できること等が確認された。

このようにアオサ発酵試料は、発酵スターターとして安定に機能することが観察されたため、この試料から海藻を発酵させる目的に使用する微生物を分離しようと考えた。そこで、3回および4回継代された元種試料（表2, No.4, No.5A）中の微生物相を精査することとした。まず、DAPI染色して得た全菌数の値が、標準寒天培地で計数した一般生菌数の値とほぼ一致したことから、試料中に優占する微生物は、寒天培地で培養可能であることが判明した。また、乳酸菌計数用の培地であるBCP添加カウントアガールによる生菌数計数値が標準寒天培地による一般生菌数計数値とほぼ同等であること、およびBCP添加カウントアガール上に形成されたコロニーの多くは、その周辺が黄変していることから乳酸菌が優占していることが示唆された。また、サブロー培地による計数により、一般生菌数より少し低いレベルで真菌類、特に酵母が優占していることが観察された。計数に用いた寒天平板上のコロニーを無作為に20株釣菌し、細菌については16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）、酵母については18S rRNA 遺伝子（18S rDNA）の部分塩基配列を決定してタイピングをおこない（表3）、さらに一般性状試験をおこなった結果、優占している微生物は、

表1 アオサ発酵試料の継代履歴

試料No.	調製日	アオサの酵素分解物の調製液組成 (w/w)			酵素分解 条件	元種の添加量(v/w)と培養条件	
		藻体(湿重量)	酵 素	その他の成分		元種	培養の仕方
No.1	1997/5/2	生 (11%)	セルラーゼR-10(0.22%), アワビアセトンパウダー(0.22%)	滅菌海水 (44%)	5℃, 48時間	—	藻体分解物を2℃下で17ヶ月放置
No.2	1998/10/9	生 (20%)	セルラーゼR-10(0.8%)	マンニトール(8.6%)	5℃, 48時間	5%	藻体分解物に元種No.1を添加して 5℃下で2ヶ月培養
No.3	1998/12/21	凍結 (83%)	セルラーゼR-10(0.42%), アワビアセトンパウダー(0.42%)	滅菌海水 (16%)	5℃, 93時間	0.5%	藻体分解物に元種No.2を添加して 20℃下で7日培養。5℃保存
No.4	1999/4/27	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (1%)	NaCl (5%)	—	1%	酵素と元種No.3を藻体に同時添加 して20℃下で8日培養。5℃保存
No.5A	1999/6/29	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (1%)	NaCl (5%)	—	1%	酵素と元種No.4を藻体に同時添加 して20℃下で8日培養。5℃保存
No.5B	1999/6/29	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (0%)	NaCl (0%)	—	0%	藻体を20℃下で8日培養
No.5C	1999/6/29	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (1%)	NaCl (5%)	—	0%	酵素を藻体に添加して20℃下で8日 培養
No.5D	1999/6/29	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (1%)	NaCl (0%)	—	1%	酵素と元種No.4を藻体に同時添加 して20℃下で8日培養
No.5E	1999/6/29	凍結 (50%)	セルラーゼR-10 (0%)	NaCl (5%)	—	1%	元種No.4を藻体に添加して20℃下 で8日培養

1種類の乳酸菌 *Lactobacillus brevis* と2種類の酵母 *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, および *Candida zeylanoides* 近縁種の計3種類と意外に単純な構成であることが判明した(表4, 表5)。この時点で、それまで官能的な臭気だけを頼りに継体してきたアオサの“発酵”という現象の本体が、アルコール発酵をともなった乳酸発酵であろうと推測できた。基質としてのアオサ藻体は、特に殺菌処理をしていないにもかかわらず、発酵後には3回植え継ぎ後の元種試料No. 4 および4回植え継ぎ後の元種試料No. 5 Aとも、上記3種以外の微生物がほとんど検出されないこと、植え継ぎ条件を一部変えても同様の傾向が認められることから、これら3種の微生物の組み合わせは単なる混合系と呼ぶよりは、もう少し何らかの意味をもつ共存系と呼ぶ方が適切と考え、微生物コンソーシアムという表現で呼ぶこととした。これら3種の微生物間に具体的にどのような相互関係があるのか、現時点では不明であるが、例えば、ある微生物を単独で接種する場合とコンソーシアムとして接種する場合とで、土着微生物群との生育競合の点で何らかの相違があるのかどうかといった点を検証するためのモデルとして使用できると考えている。なお、セルラーゼ、NaCl、元種の3要素全てを添加せず培養した対照実験ではアオサは、腐敗して悪臭を発する状態になった。このときの微生物相を調べると、藻体試料中には、当初、

黄色～橙色系の色素を有する *Flavobacterium-Cytophaga* 属系の細菌群が優占していたが、腐敗時には *Vibrio* 属および *Alteromonas* 属 (*Pseudoalteromonas* 属を含む) 系の細菌群が優占していた(表3)。アオサに限らず一般に海藻が腐敗した場合には、通性嫌気性菌である *Vibrio* 属細菌および好気性菌である *Alteromonas-Pseudoalteromonas* 属細菌が優占する傾向がある。従って、微生物相を解析することで、その海藻が腐敗状態にあるか発酵状態にあるかを客観的に評価することができる。本実験では、セルラーゼ、NaCl、元種の3要素のうち一つだけを加えないと形成される微生物相にどのような影響を与えるかという実験もおこなっている。まず元種を加えないと、アオサ試料中に酵母が優占し、官能的臭気からも発酵したと判断され、アオサの発酵には元種添加は必ずしも必須ではないと考えられた。しかし、このときの細菌相を調べると乳酸菌が優占していなかったことから元種の添加は、乳酸菌の供給という役割を果たしていることが確かめられ、少なくとも細菌相を制御するという観点から元種の添加は重要と考えられた。一方、この試料から分離された酵母のタイピングを18S rDNAの部分塩基配列に基づいておこなうと、元種試料No. 4, およびNo. 5 Aで確認された *D. hansenii* Y5201株型の他、これに非常に近縁な別タイプの *D. hansenii* も優占していた。このことから、Y5201

表2 継代されたアオサ発酵試料中の微生物相 (未発表)

試料 No. (官能臭気による評価)	添加:			直顕法	MPN法	寒天平板法 (CFU mL ⁻¹)			
	NaCl	セルラーゼ	元種	(cells mL ⁻¹)	(cells mL ⁻¹)	一般生菌 ^{*1}	乳酸菌 ^{*2}	真菌類 ^{*3}	海洋生菌 ^{*4}
No.4 (発酵)	+	+	+	1.1±0.2×10 ⁷	計数せず	6.7±1.1×10 ⁶	4.8±2.4×10 ⁶	3.1±0.1×10 ⁶ (酵母99%)	4.6±0.3×10 ⁶
No.5A (発酵)	+	+	+	6.6±1.5×10 ⁷	5.4×10 ⁷	6.0±0.1×10 ⁷	7.1±4.1×10 ⁷	2.8±1.5×10 ⁷ (酵母>98%)	8.1±2.2×10 ⁶
No.5B (腐敗)	-	-	-	2.0±0.8×10 ⁹	9.2×10 ⁸	7.2±0.4×10 ⁸	4.0±6.9×10 ⁶	<10 ⁶	8.2±0.4×10 ⁸
No.5C (発酵)	+	+	-	1.2±0.8×10 ⁸	3.5×10 ⁷	1.2±0.2×10 ⁸ (酵母>99%)	<10 ⁶	7.9±2.2×10 ⁷ (酵母>99%)	1.2±0.1×10 ⁸ (酵母>80%)
No.5D (発酵)	-	+	+	6.7±3.9×10 ⁸	計数せず	2.6±0.3×10 ⁸	2.3±0.1×10 ⁸	2.5±0.6×10 ⁶ (酵母82%)	2.3±0.6×10 ⁶
No.5E (弱い発酵)	+	-	+	1.6±0.8×10 ⁷	計数せず	8.9±0.7×10 ⁷	6.8±2.2×10 ⁷	1.3±0.3×10 ⁷ (酵母>97%)	1.4±0.3×10 ⁷

*1 異なるNaCl濃度(0, 2.5, 5%NaCl添加)で調製した標準寒天平板で計数し、最大計数値を記載した。

*2 異なるNaCl濃度(0, 5%NaCl添加)で調製したBCP添加カウントアガール平板で計数し、最大計数値を記載した。

*3 異なるNaCl濃度(0, 5%NaCl添加)で調製したサブロー平板で計数し、最大計数値を記載した。

*4 マリニアガー2216で計数した。数値は平均値±標準誤差。

表3 アオサ発酵試料より分離された細菌株の分類試験結果（未発表）

試料No.	菌 株 No.	性 状							簡 易 同 定 結 果 ^{*5}	16SrDNA部分 配列に基づく タイピング
		グラム	形態	運動性	色素	O/F	オキシダーゼ	そ の 他		
No.4 ^{*1}	B4101-B4120	+	桿菌	-	-	F	-	カララーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.brevis</i> I 型
No.5A ^{*1}	B5201-B5220	+	桿菌	-	-	F	-	カタラーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.brevis</i> I 型
No.5B 培養前 ^{*2}	B5001,B5008,B5012, B5017,B5019	-	桿菌	-	橙	-	NT ^{*4}	寒天分解 -	<i>Flavobacterium group I</i>	NT ^{*4}
	B5002,B5005,B5009, B5011,B5013	-	桿菌	-	黄	O	NT ^{*4}	寒天分解 -	<i>Flavobacterium group I</i>	NT ^{*4}
	B5006	-	桿菌	-	黄	-	NT ^{*4}	寒天分解 -	<i>Falvobacterium group I</i>	NT ^{*4}
	B5007,B5016	-	桿菌	-	黄	O	NT ^{*4}	寒天分解 +	<i>Cytophaga</i>	NT ^{*4}
	B5003	-	短桿菌	+	橙	-	NT ^{*4}		<i>Alteromonas</i>	NT ^{*4}
	B5014,B5018,B5020	-	桿菌	-	-	O	NT ^{*4}	増殖が遅くない	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT ^{*4}
	B5004,B5010	-	桿菌	-	-	-	NT ^{*4}	増殖が遅い	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT ^{*4}
	B5015	-	短桿菌	-	-	-	NT ^{*4}	増殖が遅い	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>	NT ^{*4}
	B5121,B5122,B5124,B5127, B5129,B5130,B5131,B5133, B5135,B5138,B5139	-	短桿菌	+	-	F	+	ガス産生 +	<i>Vibrio</i>	NT ^{*4}
	B5117	-	桿菌	+	-	F	+	ガス産生 +	<i>Vibrio</i>	NT ^{*4}
No.5B 培養後 ^{*3}	B5125,B5126,B5129,B5133	-	桿菌	+	-	O	+	ロゼッタを形成しない ゼラチン分解 +	<i>Alteromonas</i>	NT ^{*4}
	B5123,B5136,B5140	-	桿菌	+	-	-	±	ロゼッタを形成しない ゼラチン分解 -	<i>Alcaligenes- Pseudomonas</i>	NT ^{*4}
	B5134	+	球菌	+	-	F	+	カタラーゼ -	<i>Streptococcus-Leuconostoc</i>	NT ^{*4}
No.5C ^{*1} （細菌コロニーが分離されず）										
No.5D ^{*1}	B5401-B5405, B5408,B5410-B5420	+	桿菌	-	-	F	-	カタラーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.brevis</i> I 型
	B5406,B5409	+	桿菌	-	-	F	-	カタラーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. casei</i> I 型
	B5407	+	桿菌	-	-	F	-	カタラーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.pentosus</i> I 型
No.5E ^{*1}	B5501-B5520	+	桿菌	-	-	F	-	カタラーゼ -	<i>Lactobacillus</i>	<i>L.brevis</i> I 型

*1 BCP添加プレートカウントアガールよりランダムに20株ずつ分離。

*2 マリンアガー2216よりランダムに20株ずつ分離。

*3 標準寒天培地よりランダムに20株ずつ分離。

*4 NT：試験せず。

*5 清水のスキーム⁹⁾に基づいて分類。

表4 アオサ発酵試料から分離された細菌B5201株の同定試験結果（未発表）

	結 果
細胞形態	桿菌, 1 x 1.5~2.0 μ m
孢子の形成	—
運 動 性	—
グルコースを基質として得られる発酵産物	
乳酸（炭素換算での産生効率%）	+ (50)
エタノール	+
ガ ス	+
生育温度	
15℃	+
30℃	+
45℃	—
炭水化物からの酸産生：	
L-アラビノース, エスクリン, フルクトース, ガラクトース, グルコネート, グルコース, マルトース, リボース, D-キシロース	+
N-アセチルグルコサミン, 5-ケトグルコネート	±
アドニトール, アミグダリン, D-アラビノース, D-アラビトール, L-アラビトール, アルブチン, セロビオース, ゼルシトール, エリスリトール, D-フコース, L-フコース, ゲンチオビオース, 2-ケトグルコン酸, α -メチル-D-グルコース, グリセロール, グリコーゲン, イノシトール, イヌリン, ラクトース, D-リキソース, マンニトール, マンノース	—
GC含量 (Mol%)	45
16SrDNA塩基配列 (Acc. No. AB070607)	
最近縁種	<i>Lactobacillus brevis</i>
Acc. No. D37785に対する類似度 (%) ^{*1}	99.8
同定結果	<i>Lactobacillus brevis</i>

*1 16S rRNA遺伝子の878塩基配列（大腸菌遺伝子の第28番目から第905番目）の比較
Lactobacillus brevis (Accession No.D37785)との相同性

表5 アオサ発酵試料から分離された酵母の同定試験結果（未発表）

性 状	Y5201株	Y5206株
細胞の形態	球～少し楕円	楕 円
分裂の仕方	多極出芽	多極出芽
仮性偽菌糸の形成	—	+
子嚢胞子の形成	＋（丸い，こぶこぶ）	—
YM プロスでの生育	底に沈む，皮膜をつくる	NT*1
糖類発酵試験：		
D-グルコース，シュクロース	＋弱い	—
D-ガラクトース，マルトース，ラクトース，ラフィノース	—	—
炭素化合物資化性試験：		
D-グルコース，2-ケト-D-グルコン酸，L-ソルボース， α ， α -トレハロース，グリセロール，D-ソルビトール，D-マンニトール	＋	＋
D-グルコサミン	—	＋弱い
D-ガラクトース，D-キシロース，L-アラビノース，L-ラムノース，シュクロース，マルトース， α -メチル-D-グルコシド，セロビオース，ラフィノース，メレチトース， <i>meso</i> -エリスリトール，D-グルコン酸，D-グルクロン酸，DL-乳酸	＋	—
メリビオース，ラクトース， <i>myo</i> -イノシトール	—	—
窒素化合物資化性試験：		
硝 酸	—	—
カダベリン	＋	＋
エチルアミン	＋	＋
D-グルコサミン	—	—
L-リジン	＋	＋
ビタミン欠培地での生育	—	—
50%グルコース-酵母エキスを寒天培地での生育	—	—
35℃での生育	—	—
37℃での生育	—	NT*1
0.01%濃度シクロヘキシミド耐性	—	—
酢酸の産生	—	—
18S rDNA 塩基配列	AB070854	AB070855
（決定塩基数）	（1752 bp）	（1750 bp）
最近縁種	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>var. hansenii</i> （Acc. No. X58053）	<i>Candida zeylanoides</i> （Acc. No. AB013509）
最近縁種塩基配列との類似度（%）	99.9	99.5
同定結果	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>var. hansenii</i>	<i>Candida zeylanoides</i> - <i>related</i>

*1 試験せず。

株がもともとアオサ藻体起源であることが確かめられるとともに、異なるタイプの *D. hansenii* も確認され、かなり普遍的にアオサ藻体上に *D. hansenii* タイプの酵母が存在しているものと想像された。一方、NaCl を添加しない試験区 (No. 5 D) においてもアオサは発酵したが、無作為に20株分離して16S rDNA の塩基配列を決定した結果、2株が *L. casei* 型、1株が *L. pentosus* 型と同定された。このことからアオサ藻体上には他の種類の乳酸菌も存在していることが示された一方、低塩濃度環境下においては、*L. brevis* よりも海藻発酵系の場、よりフィットする乳酸菌が存在する可能性が示唆された。セルラーゼを添加しない試験区 (No. 5 E) では、官能的な発酵臭気が弱く、マリソアガー平板上に海洋細菌のものと推定されるコロニーが多めに計数されるなど雑菌の生育を完全に制御できていないと考えられた。セルラーゼの添加は、微生物の制御の観点からみても、海藻発酵を達成する上で重要な要素と考えられた。この様にして分離された3種類の微生物の代表菌株 *L. brevis* B5201株、*D. hansenii* Y5201株、*Candida zeylanoides*-related Y5206株の培養菌体をセルラーゼとともに添加するとアオサが乳酸発酵することが確認され、スターターとして使用できることが明らかとなった。

(2) 海藻発酵に使用する海藻原料

上記の野生型コンソーシアム (B5201株、Y5201株、Y5206株) を他の海藻に混合接種したところ、乳酸およびエタノールが産生されることが観察された (表6)。この実験においては、発酵後の微生物相を解析していないので、発酵後には接種した菌とは別の菌種が優占している可能性も考えられるが、セルラーゼとともに乳酸菌・酵母を接種するやり方で発酵してあらゆる種類の海藻を発酵させることができると考えられた。乳酸生成量からみると傾向として、顕花植物、緑藻類、紅藻類、褐藻類の順に高く、これは藻体のセルロース成分の多少を反映しているものと推察された。少ない酵素使用量で効率よく糖質の分解と発酵を達成するには、海藻基質をできるだけ微細な粒子にしておくことが重要となる。海藻粒子の微細化は意外に難しく、産業的にはメッシュNo.200 (<74 μm) を通過する規格で流通させるのが限界なようである。海藻の微細化の難易度は、手で触って知る葉体の硬さ・柔らかさの感覚と割りとよく合致する。即ち茎 (stem) 状の海藻より、葉体 (frond) 状の海藻が微細化し易く、多層構造の葉体 (thallus) より薄層構造の葉体 (frond) が微細化し易い。例えばワカメやアオサは、ホンダワラやアラメに比べ、微細化し易く、とりわけワカメは、少量のセルラーゼ使用により、その後の単細胞化も容易である。生海藻を微細化する場合、著者はマスコロイダーを使用するが、乾燥海藻粉末のような

<74 μm レベルまでには、とてもすることができない。海洋細菌は大部分がグラム陰性菌に占められ、乾燥に弱いので、海藻に含まれる一般生菌数は、乾燥過程でかなり減少し、市販ワカメ粉末の場合で数百 cfu/g レベル以下になっている。しかし実際に加熱処理等により海藻原料を滅菌しようとするとき非常に困難であることが経験される。その理由として、芽胞性の細菌が残存していることがあるが、その他粘性のある海藻多糖が保護材的役割を果たしていることが考えられる。

(3) PCR 法による菌種レベルでの微生物相の解析法の開発

海藻が順調に発酵したか判断するには、発酵後の試料中の微生物相を把握し、雑菌の生育が抑制されていることを確認することが有効な手段となる。その場合、海藻葉体の表面には、土着の乳酸菌、酵母がある頻度で存在していることを考慮すると発酵後に観察された乳酸菌、酵母が添加した乳酸菌、酵母に起源するものかどうか判断するには、少なくとも種レベルで微生物を特定しておくことが求められる。そこで16S rDNA のユニバーサルプライマーセットと菌種特異的部位をターゲットとした片側の菌種特異的プライマー (表7) を組み合わせて使用するPCR法により、乳酸菌を同定検出することを検討した。菌種特異的プライマーは、主にV3領域に逆向きに設計した。この方法によれば、検体とその菌種特異的プライマー型と適合すれば、0.5kb 付近にPCR産物が検出される。適合しなければ、約1.5kb の非特異的PCR産物だけが検出される。PCR産物が何も検出されなければ、PCR反応そのものに問題があったと判断し、実験をやり直すかあるいは除外して考える。なお、*Streptococcus thermophilus* の場合はV3領域に特異的部位が見当たらなかったためV2領域をターゲットとしたプライマーを設計した。ただし、このケースではPCR産物の大きさが197bpと小さめであるため、電気泳動後のエチジウムブロミドによる染色で見えにくいという難点があった。*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zeae* の3菌種は、塩基配列の類似性が高く1箇所だけで特異的に作用するターゲット部位がなかったため、V1およびV3領域の準特異的部位を組み合わせて特異的ターゲットとして使用する渡辺らの方法⁴⁾ を用いた。これにより、11種14菌株の乳酸菌を区別して検出することが可能となった (表8)。実際の手順としては、海藻発酵試料の生菌数測定に用いた寒天平板上に形成されたコロニーを無作為に10~20個選び、白金耳で掻き取り、各々20 μl のTEバッファに懸濁した。これを94℃で15分加熱して得た上清1 μl を鋳型DNAとして用いて菌種特異的プライマーを添加してPCR増幅をおこなった。なお、本実験に供試した *L.*

表6 各種海藻にセルラーゼと微生物コンソーシアムを添加して発酵させた結果

海 藻	(Seaweeds)	分 類	乳酸生成(g/100ml)	エタノール生成(g/100ml)
スギノリ	<i>Chondracanthus tenellus</i>		+(0.25)	+(0.18)
オゴノリ	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>		+(0.31)	+(0.23)
イバラノリ	<i>Hypnea charoides</i>		+(0.22)	+(0.16)
シキンノリ	<i>Chondracanthus charoides</i>		+(0.16)	+(0.18)
オバクサ	<i>Chondracanthus teedii</i>	紅 藻 類	+(0.12)	+(0.08)
キントキ	<i>Prionitis angusta</i>		+(0.25)	+(0.17)
ヒトツマツ	<i>Prionitis divaricata</i>		+(0.25)	+(0.41)
オオブサ	<i>Gelidium linoides</i>		+(0.18)	+(0.12)
ミゾオゴノリ	<i>Gracilaria incurvata</i>		+(0.25)	+(0.12)
ウミウチワ	<i>Padina arborescens</i>		-(<0.01)	+(0.08)
オオバモク	<i>Sargassum ringgoldianum</i>		$\pm(0.01)$	+(0.04)
ヒジキ	<i>Hizikia fusiformis</i>		$\pm(0.01)$	+(0.24)
イシゲ	<i>Ishige okamuræ</i>		$\pm(0.01)$	+(0.10)
フクリンアミジ	<i>Dilophus okamuræ</i>	褐 藻 類	$\pm(0.02)$	+(0.04)
アラメ	<i>Eisenia bicyclis</i>		$\pm(0.02)$	+(0.03)
ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i> (Whole)		+(0.23)	+(0.38)
茎ワカメ	<i>Undaria pinnatifida</i> (Stem)		+(0.25)	+(0.12)
マコンブ	<i>Laminaria japonica</i>		+(0.16)	+(0.15)
アオサ(横浜産1)	<i>Ulva</i> sp.	緑 藻 類	+(0.76)	+(0.16)
アオサ(横浜産2)	<i>Ulva</i> sp.		+(0.45)	+(0.41)
アマモ	<i>Zostera marina</i>	顕花植物	+(1.14)	+(0.26)

培養液組成：0.5g 海藻粉末(1mmメッシュ通過), 0.1gセルラーゼR10, 9ml 滅菌3.5%NaCl水。
 スターター：3株(B5201株, Y5201株, Y5206株)の菌体懸濁液(濃度OD=1)を0.05mlずつ接種。
 培養条件：20℃, 5rpm, 密栓, 7日間。

表7 乳酸菌種特異的プライマーセット (未発表)

菌 種 名	プライマー	塩 基 配 列	PCR産物(bp)
<i>L. brevis</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	B5201R1	5'-TGAACAGTTACTCTCAAAGG-3'	491
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508
<i>L. plantarum</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	LplanR1	5'-TGAACAGTTACTCTCAGATA-3'	491
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508
	LbC-1*	5'-CGAGTTCTCGTTGATGATC-3'	
	LCBC-2*	5'-AAGATTCCCTACTGCTGCC-3'	327
	LbR-1*	5'-GCAAGTCGAACGAGTTCTGATTAT-3'	
	LbR-2*	5'-GCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCA-3'	446
<i>L. zeae</i>	LbZ-1*	5'-CGAGTTTGGTCGATGAAC-3'	
	LCBC-2*	5'-AAGATTCCCTACTGCTGCC-3'	
	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	Lacid R1	5'-AGGCCAGTTACTACCTCTAT-3'	490
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508
<i>L. kefir</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	Lkfr R1	5'-AGATGTCAACAGTTACTCTGAC-3'	505
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508
<i>L. fermentum</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	Lfer R1	5'-GTATGAACAGTTACTCTCAT-3'	481
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508
	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	LbD-2*	5'-AAAGACCAGTTACTGCCTCTATC-3'	489
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	STR-1	5'-TAAATGACATGTGTCATCCA-5'	197
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	
<i>Leu. mesenteroides</i>	27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	
	Lmen R1	5'-ATTCTAGCTGTTCTTCCCAT-3'	463
	1492R	5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'	1,508

※渡辺ら⁹⁾の方法を参照。

casei IFO15883^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することが観察されたため、16S rDNA の塩基配列を決定した結果、*L. plantarum* 型であると判定された。酵母については、当初データベースの充実している18S rDNA⁹ をターゲットとして乳酸菌と同様の手法により検出する方法を開発することを検討したが、18S rDNA の変異性が乏しく、菌種特異的プライマーを設計する

ことが困難であった。近年26S rDNA の D1/D2 領域のデータベースが充実してきたため⁹、これをターゲットとした菌種特異的プライマーを利用することが考えられるが、著者らは、別の方法として10mer および12mer 長のランダム合成プライマーを用いる RAPD 法を検討した結果、*Debaryomyces hansenii* と *Candida zeylanoides* を遺伝子レベルで識別して計数することが可能であった（未発表）。

表8 菌種特異的プライマーと菌種との間の反応の特異性

供試菌株	菌種特異的プライマーとの反応性										
	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	+	—	+w	—	—	NT	NT	—	NT	NT	—
<i>L.brevis</i> IFO 12005	+	—	—	—	—	NT	NT	—	NT	NT	—
<i>L.plantarum</i> YIT 0102	—	+	—	—	—	—	—	—	NT	—	—
<i>L.plantarum</i> IAM 12477	—	+	—	—	—	—	—	—	NT	—	—
<i>L.casei</i> IFO 15883	—	+	—	—	—	—	—	—	NT	—	—
<i>L.casei</i> B5406	—	—	+	+/+w	—	—	—	—	NT	—	—
<i>L.rhamnosus</i> IAM 1118	—	—	—	+/+	—	—	+/+w	—	NT	—	—
<i>L.zeae</i> IAM 12473	—	—	—	+/+w	+	—	+w/—	—	NT	—	—
<i>L.acidophilus</i> IFO 13951	—	—	—	—	—	+w	—	—	NT	—	—
<i>L.kefir</i> YIT 0222	—	—	—	—	—	—	+/+w	—	NT	—	—
<i>L.fermentum</i> YIT 0081	—	—	—	—	—	—	—	+/+	NT	—	—
<i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT 0181	—	—	—	—	—	+w	—	+/+w	+	—	—
<i>Str.thermophilus</i> YIT2094	—	—	—	—	—	—	—	+/+w	NT	+	—
<i>Leu.mesenteroides</i> IAM 13004	—	—	—	—	—	—	—	—	NT	NT	+
PCR増幅におけるハイブリ温度(℃)	58	55	55	55/58	55	55	55/58	55/58	55	55	55

NT：試験せず。

(4) 乳酸菌と酵母の組み合わせと海藻の発酵

これまで、アオサから分離された乳酸菌と酵母を使用して、海藻の乳酸発酵に関する研究を進めてきた。それでは、他の乳酸菌と酵母の組み合わせでも海藻は発酵するであろうか。また乳酸菌あるいは酵母だけを添加した場合ではどうであろうか。これらの点について調べるため *L. brevis* B5201 株、*D. hansenii* Y5201 株、*C. zeylanoides* Y5206 株の3種からなる組み合わせ（野生型コンソーシアムと呼ぶ）と、通常食品に使用される菌種の乳酸菌と酵母で人工的に構築した *L. plantarum* と *Saccharomyces cerevisiae* および *L. acidophilus* と *S. cerevisiae* からなる組み合わせ（食品型コンソーシアムと呼ぶ）をスターターとして使用して発酵試験をおこなった。基質は殺菌処理されていないワカメ乾燥粉末を使用した。スターターとしてどの程度有効に機能したかは、培養後の海藻試料中の細菌相を調べ、添加した乳酸菌種が生菌数全体に占める割合（優占率）から評価した。なお、この実験に供試した *L. acidophilus* IAM10074 株は、*L. acidophilus* 特異的プライマーに反応しなかったため、16S rDNA の塩基配列を決定してみると *L. casei* 型であることが判明し、検出は *L. casei* 特異的プライマーを使用した。この実験から、野生型コンソーシアムに限らず、食品分野と関連の深い乳酸菌と酵母の組み合わせでも海藻発酵スターターとして有効であることが示されたが、野生型コンソーシアムの方がやや優れている傾向が認められた（表9）。乳酸菌を単独で添加する場合と酵母とともに接種する場合とでは *L. brevis* および *L. plantarum* を使用した場合は、酵母添加の有無にかかわらず添加した乳酸菌の優占率が高い一方、*L. acidophilus* (*casei*) の場合は、むしろ乳酸菌単独添加の方が優占率が高いこと、酵母の単独添加では乳酸菌が必ずしも優占しないこと等が観察された。乳酸菌添加をしなかった対照区においてもときどき *L. brevis* が高い頻度で検出される場合があることは、*L. brevis* がワカメ原料中にある頻度で存在しているということとワカメ発酵の系に適しているということを示唆した。この実験の結果からは、海藻の乳酸発酵において、酵母の添加は微生物相の制御の点から見て必ずしも必要とされないということであるが、塩分濃度等の発酵条件が変化したときに優位性がでてくとも考えられ、今後さらに研究を積み上げて判断する必要がある。一方、機能面からいうと、乳酸菌単独添加による発酵では、発酵産物は臭気に乏しく、酵母の添加は、発酵物にエステル様の芳香臭を付与することに貢献している。食品素材等への利用を考える場合、目的に応じて酵母をスターターの構成に加えるかどうか選択できる。

(5) 海藻発酵に適した乳酸菌の種類

前項の実験より、乳酸菌の単独使用でも海藻の乳酸発酵が問題なく達成されるということが判明した。そこで表の11種14株の乳酸菌を単独使用してワカメを基質として発酵させ、海藻発酵スターターとしての使用に適した乳酸菌種の検索をおこなった（表10）。スターターとしての有効性は、菌種特異的プライマーを使用して発酵後の微生物相を調べ、被験菌の優占率が高いものを優れるものとして評価した。その結果、とりわけ成績が良かった菌種としては、各乳酸菌を単独で接種した場合においては *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* の4菌種が挙げられた（表11, 図1）。10種11株の乳酸菌を混合接種した場合においては、NaCl 添加の場合で、*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* の3菌種、NaCl 非添加の場合で、*L. plantarum*, *L. rhamnosus* が優れていると判断された（図2）。*L. brevis* がヘテロ型の乳酸発酵菌であるのに対し、*L. plantarum* および *L. rhamnosus* はホモ型の乳酸発酵菌であり、乳酸生成量が多く試料のpHを低化させる能力が高い（表11）。このことが、変敗菌の出現しやすいNaCl 非添加系においても良好な乳酸発酵能を達成した理由と考えられる。全体としてみると、植物系乳酸菌⁹⁾と呼ばれる菌種を使用した場合に優占率が高く、動物（乳）系乳酸菌と呼ばれる菌種を使用した場合に優占率が低い傾向にあった。植物性乳酸菌であれば比較的菌種を選ばず海藻発酵スターターとして使用できることが示されたことから、今後さまざまな乳酸菌種を使用した海藻発酵産物が調製され、その特性を生かした利用がされていくものと期待される。

(6) 海藻発酵の培養条件の検討

著者らが開発した海藻の発酵技術には、海藻を乳酸発酵させるということの他、組織を単細胞化するというもう一つの特長がある。即ち、海藻組織をセルラーゼを主体とする糖質分解酵素で分解し、単細胞性粒子に変換しながら、乳酸菌と酵母により乳酸発酵を誘導している（図3）。安定した品質が期待できる市販ワカメ乾燥粉末を基質とし、前述の野生型コンソーシアムをスターターとして使用し、発酵諸条件の検討をおこなった⁹⁾。

a : 海藻基質の濃度

発酵時の海藻の濃度については、濃度が高いほど製造コスト面からは有利と考えられる。ワカメ粉末の場合、乾物として最大で10% (w/w) まで添加が可能であった。ただし10%添加では、攪拌に難があり、サンプリングも容易でないため発酵実験は、5%添加の系を基本としておこなった。

b : NaCl 濃度

NaCl 濃度については、物性面から2.5%-3.5%が発酵に適していると判断された。これよりもNaCl 濃度が低

表9 乳酸菌と酵母の組み合わせを変えて接種した場合のワカメ液中の細菌相の比較（未発表）

微生物の組み合わせ	試料 1 ^{*1}				試料 2 ^{*1}			
	菌種特異的プライマーでの検出頻度 ^{*3}				菌種特異的プライマーでの検出頻度 ^{*3}			
	乳酸菌% ^{*2}	<i>brevis</i>	<i>plantarum</i>	<i>casei</i>	乳酸菌% ^{*2}	<i>brevis</i>	<i>plantarum</i>	<i>casei</i>
菌接種なし対照区	80.6	1/10	NT	NT	>99	7/8	0/8	NT
野生型コンソーシアム								
B5201, Y5201, Y5206	>99	10/10	NT	NT	>99	10/10	NT	NT
B5201	>99	10/10	NT	NT	>99	10/10	NT	NT
B5201, Y5201	>99	10/10	NT	NT	>78.9	10/10	NT	NT
B5201, Y5206	>78.9	10/10	NT	NT	>96.4	10/10	NT	NT
Y5201	<11.1	NT	NT	NT	>99	NT	NT	NT
Y5206	<2.2	NT	NT	NT	52.4	NT	NT	NT
Y5201, Y5206	<3.7	8/8	NT	NT	86.0	NT	NT	NT
食品型コンソーシアム ^{*4}								
<i>L. plantarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>	>99	NT	9/10	NT	>88.4	NT	6/10	NT
<i>L. plantarum</i>	>99	NT	9/10	NT	>90.1	NT	5/10	NT
<i>S. cerevisiae</i>	<11.1	NT	9/10	NT	>99	NT	NT	NT
<i>L. acidophilus</i> , <i>S. cerevisiae</i>	>99	NT	NT	3/9	>83.5	NT	NT	0/10
<i>L. acidophilus</i>	>99	NT	NT	10/10	>99	NT	NT	7/9

*1 発酵試験は2本立て(試料1, 試料2)でおこなった。

*2 酸産生コロニー数/全コロニー数×100

*3 陽性コロニー数/検体数。BCP添加カウントアガール平板上の酸産生コロニーを無作為に10株選んで分離して検体とした。
NT: 試験せず。*4 菌株は*L. plantarum* IAM12477, *L. acidophilus* IAM10074, *S. cerevisiae* IAM4512を使用。
L. acidophilus IAM10074は, *L. acidophilus*特異的プライマーに反応せず, *L. casei*特異的プライマーに反応した。

表10 ワカメ発酵試験に使用した菌株リスト

試験区	菌 種	乳 酸 菌 の 特 徴		
		分 離 源	動/植物性	乳酸発酵型
1	<i>Lactobacillus brevis</i> B5201	発酵海藻	植物性	ヘテロ
2	<i>Lactobacillus brevis</i> IFO12005	不明	植物性	ヘテロ
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> YIT0102 ^T	発酵キャベツ	植物性	ホモ
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> IAM12477 ^T	発酵キャベツ	植物性	ホモ
5	<i>Lactobacillus casei</i> IFO15883 ^{T*1}	チーズ	動・植物性	ホモ
6	<i>Lactobacillus casei</i> B5406	発酵海藻	動・植物性	ホモ
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> IAM1118 ^T	ヒト口腔	動・植物性	ホモ
8	<i>Lactobacillus zeae</i> IAM12473 ^T	チーズ	動物性	ホモ
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO13951 ^T	不明	動物性	ホモ
10	<i>Lactobacillus kefir</i> YIT0222 ^T	ケフィール	動物性	ヘテロ
11	<i>Lactobacillus fermentum</i> YIT0081 ^T	発酵ビート	動・植物性	ヘテロ
12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> YIT0181 ^T	ヨーグルト	動物性	ホモ
13	<i>Streptococcus thermophilus</i> YIT2094	乾燥ヨーグルト種	動物性	ホモ
14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IAM13004 ^T	オリーブ	植物性	ヘテロ
C	乳酸菌無接種対照区	—	—	—
M	混合接種区 ^{*2}	—	—	—

*1 *Lactobacillus casei* IFO15883は、16S rRNAの塩基配列からは *Lactobacillus plantarum* と判定された。

*2 試験区1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14の菌株を36 μ lずつ混合接種した。

表11 培養後のワカメ懸濁液の性状（未発表）

試験区	NaCl 添加区* ¹				NaCl 非添加区* ¹			
	臭気判定* ²	pH	乳酸生成量(g/L)	生菌数(CFU/g)	臭気判定* ²	pH	乳酸生成量(g/L)	生菌数(CFU/g)
1	発酵・発酵・発酵	4.8	0.68	1.7×10^8	発酵・変敗・変敗	4.9	0.43	9.5×10^7
2	発酵・発酵・発酵	4.9	0.64	1.2×10^8	変敗・変敗・変敗	5.3	0.07	7.8×10^7
3	発酵・発酵・発酵	4.1	2.12	1.3×10^8	発酵・発酵・発酵	4.3	1.84	5.5×10^8
4	発酵・発酵・発酵	4.1	2.20	1.1×10^8	発酵・発酵・発酵	4.3	1.85	7.6×10^8
5	発酵・発酵・発酵	4.1	1.99	1.8×10^8	発酵・発酵・発酵	4.3	1.59	6.6×10^8
6	発酵・発酵・発酵	4.1	1.66	2.4×10^8	発酵・発酵・発酵	4.3	1.82	1.0×10^9
7	発酵・発酵・発酵	4.1	1.64	3.0×10^8	発酵・発酵・発酵	4.3	1.64	1.7×10^8
8	発酵・腐敗・腐敗	4.2	1.65	2.3×10^8	腐敗・腐敗・腐敗	4.7	測定せず	4.9×10^8
9	発酵・発酵・腐敗	4.9	0.55	2.7×10^7	発酵・変敗・腐敗	5.1	測定せず	2.5×10^8
10	発酵・発酵・発酵	4.1	測定せず	7.5×10^7	発酵・発酵・発酵	4.5	測定せず	1.1×10^9
11	発酵・発酵・腐敗	4.1	測定せず	2.1×10^8	発酵・発酵・腐敗	4.6	測定せず	9.9×10^8
12	発酵・発酵・発酵	4.4	0.83	2.8×10^7	発酵・腐敗・腐敗	5.2	測定せず	2.2×10^8
13	腐敗・腐敗・腐敗	4.9	測定せず	1.5×10^7	腐敗・腐敗・腐敗	5.3	測定せず	7.4×10^7
14	発酵・発酵・発酵	4.2	測定せず	3.3×10^8	発酵・発酵・腐敗	5.0	測定せず	4.7×10^8
C	発酵・腐敗・腐敗	4.9	0.45	1.5×10^7	腐敗・腐敗・腐敗	5.1	0.42	6.2×10^7
M	発酵・発酵・発酵	4.0	1.70	1.8×10^8	発酵・発酵・発酵	4.4	1.39	5.1×10^8

*1 培養液の組成：乾燥ワカメ粉末2.0g, 3.5%(w/v)NaCl水もしくは蒸留水40ml, セルラーゼ12S 40mg, 菌体懸濁液(OD=1)0.4ml。

*2 酸っぱい臭いもしくは海藻本来の臭いがある場合を発酵、チーズ臭がある場合を変敗、腐敗臭がある場合を腐敗とした。
(試験は3本立てで実施し、pH、乳酸生成量、生菌数は3本の平均値で記載した)

■ 接種した乳酸菌種 ▨ その他の乳酸菌種 □ 非乳酸菌

a. NaCl添加区

■ 接種した乳酸菌種 ▨ その他の乳酸菌種 □ 非乳酸菌

b. NaCl非添加区

図1 乳酸菌スターターの種類と優占率

■ *L.plantarum* □ *L.brevis* ▨ *L.casei* ▩ *L.rhamnosus*

図2 乳酸菌を混合接種した場合のワカメ液の菌種組成

いと試料の粘性が高くなり攪拌が困難であった。また、NaCl無添加の場合、ワカメ粉末がダマになり懸濁させにくいということもあった。逆に、NaCl濃度が高いと、培養に従い浸透圧の関係で海藻試料が収縮し、固相と液相の分離が顕著となり不都合であった。微生物相に与える影響の観点からNaClの適正濃度を評価する研究も今後おこなわれる必要があるが、これまでの経験からNaCl濃度が高いと生菌数レベルが低めになること、乳酸菌と酵母のバランスでは酵母の方に有利にはたらくこと、雑菌が生育しにくく腐敗のリスクが低くなること等の傾向が認められた。また、ワカメおよびアオサを基質

にした実験において、多くの乳酸菌の場合でNaCl添加区の方がNaCl非添加区よりも乳酸生成量が多くなる傾向が認められた。

c: 培養温度

培養温度については、セルラーゼで分解されて生成してくる単細胞性粒子の重量割合をコールターカウンターで測定して、分解効率の観点から評価した。その結果、培養開始後24時間以内という短期間でみると5℃から20℃までの範囲で温度に依存した生成効率の違いが認められたが、2週間経過した時点では5℃から50℃までの範囲で生成効率に大きな違いが認められなかった(図4)。

図3 海藻発酵技術の基本原則

図4. 培養温度とワカメ液中の単細胞性粒子の生成効率
(Uchida and Murata, 2002⁹⁾)

従って、好ましい微生物相を得られる温度を以って適正温度とするのが一つの考え方と思われた。現在までのところ当研究室では海洋細菌の培養に一般的に使用される20℃での培養を基本として発酵技術を検討してきた。今後、他の温度域での発酵培養も検討される価値がある。例えば、低温下においても単細胞化の効率が変わらないことから最初低温下において酵素分解処理をおこない、pHの低下を待って常温発酵に移行するといったテクニックにより、腐敗のリスクが低減されると期待される。

d : セルラーゼ濃度

セルラーゼの適正濃度について、0-3% (w/v) の範囲で検討した。スターターを添加せずセルラーゼだけを添加して単細胞化粒子の生成収率を調べると、24時間後という短期の評価では、セルラーゼ濃度が1%で最大の収率が得られ、12日後という中期の評価では、むしろ0.25%前後の低濃度での使用により最大の収率が得られ、コストの面からも好ましいと考えられた (図5)。しかし、微生物相からみるとセルラーゼ濃度が1%以下であると乳酸菌以外の微生物が成育し、腐敗がおり問題であった (表12)。一方、野生型コンソーシアムをスター

図5 セルラーゼ濃度と単細胞性粒子の生成効率
(Uchida and Murata, 2002⁹⁾)

表12 セルラーゼ濃度とスターター添加の有無がワカメの発酵に与える影響

試験区	評価項目	セルラーゼ濃度 (w/v)				
		0	0.25	0.5	1.0	3.0
スターター非添加区	臭気の官能的評価	腐敗	腐敗	腐敗気味発酵	発酵	発酵
	pH (平均)	4.9	5.8	4.2	5.6	5.3
	乳酸菌の割合 ^{*1} (平均%)	<5	<5	33.7	NT ^{*2}	99.4
スターター添加区	臭気の官能的評価	腐敗	発酵	発酵	発酵	発酵
	pH (平均)	4.9	4.2	4.2	4.1	4.1
	乳酸菌の割合 ^{*1} (平均%)	54.2	108	85.5	108	106

*1 乳酸菌の割合% = BCP添加カウントアガールで計数した乳酸菌数 / 標準寒天培地で計数した一般生菌数 x 100

*2 Not tested : 試験は二本立てでおこない平均値を記載した。

ターとして添加して同様の実験をおこなうとセルラーゼ濃度が0.25%でも腐敗がおこらず、乳酸発酵を安定に達成できた。現在では、ワカメ乾燥粉末を基質として10% (w/v) 濃度で添加する場合、セルラーゼが0.1%濃度でも十分に単細胞化と乳酸発酵が達成されることが確認されている。

4. 海藻発酵物の利用

(1) 水産飼料素材としての利用とマリンサイレージの概念

新しい素材である海藻の乳酸発酵物は、様々な産業利用のされ方が期待されている。その中で著者らは、早くから水産飼料としての利用に焦点を絞って可能性を検討してきた。少し広い視野で眺めると農業分野では、植物を発酵させて堆肥として利用することが普及しており、また、畜産分野では、牧草を乳酸発酵させて家畜の飼料とする技術が確立されている。水産分野でもこれに似た技術を導入できないかという発想から産まれたのがマリンサイレージの考えである(図6)。マリンサイレージとは、即ち“魚介類の栽培を目的として海藻(藻類)を発酵させて調製した飼料”と定義している。マリンサイレージの開発は、さらに二つの範疇に分けて検討を行っ

ている。一つめは、従来型の水産増養殖のなかで培養に手間がかかる微細藻類餌料の代替品として利用できないかという方向である。二つめの利用の方向は、従来型の水産増養殖の枠を超え、環境と調和した新しい水産増養殖のやり方を提案しようとする試みである。最初の代替餌料としての利用から述べる。二枚貝類の養殖は、現在までのところ天然の微細藻類を餌として利用しながら、自然まかせの不安定なかたちで実践されているため、産業規模で安定供給できる餌飼料素材の開発が望まれている。乾燥粉末ワカメを乳酸発酵させて調製した単細胞性飼料(FSCD)の飼料効果についてアコヤガイ初期稚貝を対象として調べた結果を表13に示してある。アコヤガイの理想的な餌とされるキートセロス(*Chaetoceros calcitrans*)を30,000cells/ml/dayで投与した場合に最も良い貝殻成長率 $168\mu\text{m/day}$ (生残率66.7%)が得られ、無給餌区での成績は貝殻成長率 $-10\mu\text{m/day}$ (生残率53.3%)であった。一方FSCDを20,000cells/ml/dayで単独投与した場合、貝殻成長率 $30\mu\text{m/day}$ (生残率53.3%)となり、それほど高いとはいえないが飼料としての価値を有していることが示された。さらにFSCD 20,000cells/ml/dayに加えてキートセロスを3,000 cells/ml/dayで給餌した場合、貝殻成長率 $130\mu\text{m/day}$ (生

図6 水産飼料素材としての利用とマリンサイレージの概念図

残率80.0%)と高い成績が得られた。キートセロスを単独で3,000cells/ml/dayで投与した場合には、それほど高い飼料効果は認められず、FSCDと少量のキートセロスと併用給餌することにより、相乗的な飼料効果が発現していると考えられた。相乗的な飼料効果がおこる理由は不明であるが、FSCD単独投与では何か微量な栄養成分が不足して律速になっていて、キートセロスと併用給餌することにより、それが補われるとこのようなことがおこりうると考えている。

次にマリンサイレージを利用した新しい水産増養殖の構築への取り組みについて述べる。近年、全国各地の富栄養化した内湾域でアオサが大量繁殖し、その藻体の処分法をめぐり、自治体等が頭を悩ませている例が目立つ。そこで、このアオサをマリンサイレージの技術で飼料素材に変換し、二枚貝、仔魚等の餌として利用できないかということを検討している。アオサは、沿岸域の栄養塩を吸収したものであるが、これをアサリ等の有用水産物資源の生産に結び付けることができれば、地元住民の潮干狩りという行為により、栄養塩が陸揚げされ、無償で海洋の浄化がなされる構図となる。循環型の食糧生産システムということもできる¹⁰⁾。従来型の水産増養殖では、魚の増養殖を持続するために環境浄化に取り組む必要があるという視点であるのに対し、マリンサイレージの考えでは、環境問題を解決するために増養殖を利用しよう

ということであり視点が逆となる。また従来の水産増養殖は、最初に増養殖すべき魚種を決め、次にその餌を培養することを考え、最後にその餌の餌を培養することを検討するといった順序で研究開発がおこなわれる。一方、マリンサイレージ方式では、最初に餌として利用すべき海藻資源(第1次生産)を決め、それをいかに経済的価値の高い魚種(高次生産)に効率よくリンクさせるかという視点で研究開発がおこなわれることとなる。マリンサイレージは、単に新しい餌飼料素材を提供するだけでなく、“海の堆肥技術”ともいうべき概念と新しい環境調和型水産増養殖システムを提案している。

(2) 食品素材としての利用

水産餌飼料素材として開発された海藻発酵産物であるが、海洋由来の植物性素材を乳酸発酵させて得た初の食品素材という位置づけから、食品素材としての利用も大きな可能性をもっている。前節までの検討で、単細胞化の効率は海藻の種類により異なるが、乳酸発酵は、海藻の種類を選ばず比較的容易に達成されると見込まれること、また植物性の乳酸菌であれば、比較的種を選ばずスターターとして使用できることの2点が明らかにされた。特に海藻の種類を選ぶと物性、色、臭気の面で、かなりバリエーションに富む素材が得られることがわかっている。一方、著者らは、海藻発酵素材の健康機能性を探るために、ラット食餌試験により、脂質代謝改善効果のみ

表13 ワカメ発酵飼料のアコヤガイ稚貝に対する飼育試験の結果(未発表)

試 験 区	投 餌 条 件	貝殻の成長 (μ m/day)	生残(%)
無給餌区	無 給 餌	-10	53.3
キートセロス区	<i>Chaetoceros calcitrans</i> 3×10^4 cells/ml/day	168	66.7
キートセロス 1/10区	<i>Chaetoceros calcitrans</i> 3×10^3 cells/ml/day	11	66.7
発酵ワカメ区	発酵ワカメ粒子 2×10^4 cells/ml/day	30	53.3
発酵ワカメ+キートセロス 1/10区	発酵ワカメ粒子 2×10^4 cells/ml/day + <i>Chaetoceros calcitrans</i> 3×10^3 cells/ml/day	130	80.0
ワカメ区	ワカメ粒子 2×10^4 cells/ml/day	32	66.7
ワカメ区+キートセロス 1/10区	発酵ワカメ粒子 2×10^4 cells/ml/day + <i>Chaetoceros calcitrans</i> 3×10^3 cells/ml/day	51	93.3

る実験をおこなった。発酵ワカメを10%添加した飼料で3週間飼育したラットは、ワカメを添加しない飼料を食させた対照区のラットに比べ、血中及び肝臓中のトリアシルグリセロール値が有意に低下していた（図7、未発表）。また肝臓中のコレステロール値も有意に低下していた。発酵処理しないワカメを同じ量含む飼料で飼育したラットにおいてもトリアシルグリセロール値の低下傾向は認められたが発酵ワカメ区のほうが低下が顕著であった。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亢進が示唆された。ワカメ自体が有する脂質代謝改善作用は既に報告^{11,12)}されているところであり、乳酸発酵という処理がその作用を“有意に”増強するかどうかという点についてはさらに追試で確認する必要があると考えるが、“海藻”と“乳酸発酵”の二つの要素が合わさった海藻発酵素材は、様々な健康機能性を有する可能性があり、今後、研究の裾野が広がることを期待する。

図7 ワカメを10%含む餌で3週間飼育したラットのトリアシルグリセロール値 $P < 0.05$ (未発表)

5. おわりに

海藻は、一般に糖質成分が多く、粗タンパク含量が少ないという特色を有する。ワカメに野生型コンソーシアムを添加し、NaCl非添加の条件下で発酵させると著しい発泡と海藻の液状化がおり、発酵後のワカメの一般成分が表14のように高タンパクな組成に変化する場合がある。この現象は、糖質が分解され、脱炭酸が強力におこったためと推察されている。このような強力な糖質分解と脱炭酸は、スターターとして添加した乳酸菌・酵母によりなされているとは考えにくく、発酵に第4番目の

微生物が関与している可能性があると考え、このような現象のおこった試料中の微生物相の解析を進めている。今回著者らが開発したのは、海藻“発酵型”の微生物コンソーシアムと位置づけているが、さらに第4番目の微生物を加えることにより、海藻“分解・発酵型”の微生物コンソーシアムの開発ができるものと期待している。地球規模でのタンパク資源の不足が懸念されているなかで、海藻バイオマス資源を高タンパク素材に変換する発酵技術が開発されれば、応用的価値は高い。

表14 発酵処理によるワカメの一般成分組成の変化

	粗タンパク	脂 質	炭水化物	灰 分
ワカメ粉末(発酵前)	33.1±1.2	4.4±0.3	44.4	16.8±0.0
ワカメ粉末(発酵後)	39.6±0.5	5.4±0.3	35.1	18.9±0.1

平均値±標準誤差。乾物換算(%)

炭水化物=100%-(粗タンパク%+脂質%+灰分%)

文 献

- 1) 西澤一俊, 村杉幸子: 海藻の本, 食の源をさぐる, 研成社(東京)(1988)
- 2) Uchida, M., Nakata, K. and Maeda, M.: 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 (1997).
- 3) Uchida, M., Nakata, K. and Maeda, M.: 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 (1997).
- 4) 清水 潮: 海洋細菌の同定, 海洋微生物研究法, 門田元編, 学会出版センター(東京), 228-233 (1985).
- 5) 渡辺幸一, 三宅妙子, 松木隆広, 小柳津広志: 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* 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) 129-154 (1998).
- 6) Suzuki, M. and Nakase T.: 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 (1999).
- 7) Kurtzman, C. P. and Robnett, C.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit(26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 331-371 (1998).
- 8) 岡田早苗: 植物性乳酸菌とその秘める可能性, 日本乳酸菌学会誌, **13**, 23-36(2002).
- 9) Uchida, M. and Murata, M.: Fermentative preparation of single cell detritus from seaweed, *Undaria pinnatifida*, suitable as a replacement hatchery diet for unicellular algae. *Aquaculture*, **207**, 345-357 (2002).
- 10) 内田基晴, 村田昌一: 海藻を微粒子化し, 稚魚や貝の飼料として利用するマリンサイレージを開発, ブレインテクノニュース, **89**, 7-10 (2002).
- 11) Murata, M., Ishihara, K. and Saito, H.: Hepatic fatty acid oxidation enzyme activities are stimulated in rats fed the brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame). *J. Nutri.*, **129**, 146-151 (1999).
- 12) Murata, M., Sano, Y., Ishihara, K. and Uchida, M.: Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum liver triacylglycerol. *J. Nutri.*, **132**, 742-747(2002).

Fermentation of Seaweed

Motoharu UCHIDA

*National Research Institute of Fisheries Science, Fish Research Agency
Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan.*

A method for performing lactic acid fermentation on seaweed was recently developed. This method consists of two steps: degradation of seaweed to the single-cell level by cellulase, followed by lactic acid fermentation in the presence of lactic acid bacteria and yeast. Microbiological findings and technical progress on seaweed fermentation will be described in this paper including the future prospects for industrial use. First, one lactic acid bacteria strain, *Lactobacillus brevis*, and two yeast strains, *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, and a *Candida zeylanoides*-related strain were isolated from a fermented culture of *Ulva* spp. Lactic acid fermentation on various kinds of seaweed was induced by adding these three microorganisms as starters along with cellulase. Lactic acid fermentation on seaweed was also performed by adding different combinations of lactic acid bacteria and yeast or lactic acid bacteria alone as starters. Plant origin lactic acid bacteria proved to be more suitable for seaweed fermentation than dairy origin lactic acid bacteria. The fermented product of seaweed appears to be suitable for use as a dietary item for aquatic animals, namely as "marine silage", or as a human food or food component. New industries based on the fermented products of marine algal materials are suggested in this paper.

Key Words : *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Lactobacillus brevis*, marine silage, seaweed