

# アケビ由来発酵酵素液中に含まれる微生物の同定と機能性の検討

美作大学短期大学部栄養学科

桑守正範

アケビ発酵液分析の結果、*Fructobacillus pseudoficulneus* (果実、花などからの分離例がある乳酸桿菌で2008年にEndoらにより同定)、*Leuconostoc pseudomesenteroides* (グルコースからガスを生成する乳酸球菌で植物、牛乳、乳製品から分離)、*Candida zemplinina* (ワインおよびワインの発酵過程からの分離例がある)が検出された。アケビ発酵液は二酸化炭素発生力が強いことがこれまでの経験から判明していたが、本細菌叢はこのことを裏付ける結果であった。

## 序論

アケビは自然界でも特に強力な酵母を有する。葉ら<sup>1-2)</sup>はアケビ果実は中身が露出しているにもかかわらず、実が腐ることがないのは酵母膜による保護がなされているから、と報告している。また、図1に示すように、アケビ発酵液を稲作初期に用いると、用いないものに比して根の張り方が良好になる、という知見も得ている。ただし、本酵母がどのようなものなのか、どのような生成物を生じているのかは未だ解明されていない。本研究ではアケビ発酵液に含まれる酵母をはじめとする微生物を同定し、生成物の種類を特定すると共に、稲作以外の用途、たとえば食用への転化などの可能性を検討した。



写真-1. イネにおけるアケビ発酵液の発根促進効果  
左がアケビ発酵液を使用した苗代(2014年5月撮影)

## 方法

### 1. 試料

試料には2013年に津山市北部で採取したアケビを20%ショ糖液を用いて追発酵させたものを用いた。発酵に於いては発行状況を観察し、適宜ショ糖を加えた。発酵は常温下において蓋をした容器内で行い、二酸化炭素生成による容器の変形を防ぐため、容器内部の空気の逃げ口を確保した。容器内は半密閉状態に有り、発生する二酸化炭素の影響下においてはゆるやかな嫌気的条件下にあったものと考えられる。

### 2. アケビ発酵液のマイクロフローラ(細菌叢)の分析

アケビ発酵液のマイクロフローラの分析は日本食品分析センター(大阪)に依頼した。依頼内容は検体1g当たりの生菌数、検体中の主な介在微生物を測定後、検出された乳酸菌・酵母に関してはDNA鑑定を行い、種の同定を行った。

#### 2-1. 介在微生物の検索

各種培地を用いて検体の生菌数を測定した後、培養平板上に優勢に生育した集落を釣菌して分離菌とし、各分離菌について携帯観察を行った。生菌数測定における培養条件は以下の通りである。

好気性細菌：アンホテリシンB加SCD寒天培地に於いて30℃、4日間、好気

高温性細菌：アンホテリシン B 加 SCD 寒天培地に於いて 55℃, 4 日間, 好気

耐熱性芽胞：アンホテリシン B 加 SCD 寒天培地に於いて 30℃, 4 日間, 好気

腸内細菌：DHL 寒天培地に於いて 35℃, 1 日間, 好気

グラム陰性菌：アンホテリシン B 加 CVT 寒天培地に於いて 30℃, 4 日間, 好気

グラム陽性菌：アンホテリシン B 加コロンビア CAN 寒天培地に於いて 30℃, 4 日間, 好気

乳酸菌：アンホテリシン B 加 MRS 寒天培地に於いて 30℃, 4 日間, 嫌気

嫌気性細菌：アンホテリシン B 加ゲンタマイシン加 GAM 寒天培地に於いて 35℃, 4 日間, 嫌気

中温性放線菌：アンホテリシン B 加アルブミン寒天培地に於いて 30℃, 1 4 日間, 好気

高温性放線菌：アンホテリシン B 加アルブミン寒天培地に於いて 55℃, 1 4 日間, 好気

カビ・酵母：クロラムフェニコール加 PD(10%) 寒天培地に於いて 25℃, 7 日間, 好気

## 2-2. 乳酸球菌・乳酸桿菌・酵母の塩基配列分析

検体から得られた乳酸桿菌および乳酸球菌について生理的性状試験を行った。また同菌については DNA を抽出し、PCR 法により 16SrRNA 領域の DNA を増幅した。公算については DNA を抽出し、PCR 法により Large subunit rRNA の D2 領域 DNA を増幅した。増幅した各 DNA について、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation) を用いて塩基配列を解析した。得られた配列を国際塩基配列データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている配列、および MicroSeq ID Analysis Software (Life Technology Corporation) のデータベースと相同性検索を行い、近縁種との系統樹を近隣結合法 (NJ 法) により作成した。

## 結果および考察

アケビ発酵液のマイクロフローラ分析結果

アケビ発酵液のマイクロフローラの分析結果を表-1 に示す。検体 1 g あたりの生菌数が多かったのは

好気性細菌、グラム陽性菌、乳酸菌、酵母であり、乳酸菌はこの中で最も生菌数が多かった。次に検体中の主な介在微生物数を表-2 に示す。1 g 当たりの概数は乳酸桿菌と乳酸球菌が共に  $2 \times 10^8$  で最も多く、 $4 \times 10^4$  の酵母がこれに続いた。

分離された乳酸球菌・乳酸桿菌・酵母の最近縁種

分離された乳酸球菌・乳酸桿菌・酵母の最近縁種および決定された塩基数を表-3 に、乳酸球菌および乳酸桿菌の性状試験結果を表-4 に、相同性検索の結果を表-5~7 に示した。また近隣結合法 (NJ 法) により作成した系統樹を図-1~3 に、顕微鏡下の分離乳酸桿菌、乳酸球菌、酵母の形態を写真-2-4 に示した。

表-1 検体 1 g 当たりの生菌数

寒天培地	培養条件	対象菌	検体 1 g 当たりの生菌数
アンホテリシン B 加 SCD	30℃, 4 日間, 好気	好気性細菌	$3.8 \times 10^8$
アンホテリシン B 加 SCD	55℃, 4 日間, 好気	高温性細菌	100 以下
アンホテリシン B 加 SCD	30℃, 4 日間, 好気	耐熱性芽胞*	$1 \times 10^2$
DHL	35℃, 1 日間, 好気	腸内細菌	100 以下
アンホテリシン B 加 CVT	30℃, 4 日間, 好気	グラム陰性菌	$3.2 \times 10^3$
アンホテリシン B 加コロンビア CAN	30℃, 4 日間, 好気	グラム陽性菌	$2.1 \times 10^8$
アンホテリシン B 加 MRS	30℃, 4 日間, 嫌気	乳酸菌	$3.9 \times 10^8$
アンホテリシン B 加ゲンタマイシン加 GAM	35℃, 4 日間, 嫌気	嫌気性細菌	100 以下
アンホテリシン B 加アルブミン	30℃, 14 日間, 好気	中温性放線菌	100 以下
アンホテリシン B 加アルブミン	55℃, 14 日間, 好気	高温性放線菌	100 以下
クロラムフェニコール加 PD (10%)	25℃, 7 日間, 好気	カビ 酵母	100 以下 $3.6 \times 10^4$

\* 80℃, 10 分間の加熱処理を行った後、試験した。

表-2 検体中の主な介在微生物

分離菌群	1 g 当たりの概数
乳酸桿菌	$2 \times 10^8$
乳酸球菌	$2 \times 10^8$
酵母	$4 \times 10^4$
非発酵性グラム陰性桿菌	$3 \times 10^3$
好気性芽胞菌 中温性	$1 \times 10^2$

表-3 分離菌の最近縁種及び決定された塩基数

分離菌	分類	最近縁種	決定された塩基数 (bp)
a	乳酸桿菌	<i>Fructobacillus pseudoficulus</i>	480
b	乳酸球菌	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	473
c	酵母	<i>Candida zemplinina</i>	190

表-4 分離菌a及びbの性状

試験項目	試験結果	
	a	b
形態	桿菌*1	連鎖球菌*2
グラム染色性	+	+
孢子	-	-
運動性	-	-
酸素に対する態度	通性嫌気性	通性嫌気性
カタラーゼ	-	-
集落の色調	NP*3	NP

\*1 写真-1

\*2 写真-2

\*3 NP：特徴的集落色素を生成せず

表-5 分離菌aの同源性検索結果

菌種	% Match
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i> <AY169967>	100.00
<i>Fructobacillus tropaeoli</i> <AB542054>	99.36
<i>Fructobacillus ficulneus</i> <AF360736>	95.68
<i>Leuconostoc palmae</i> <AM940225>	90.24
<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i> (ATCC=19255)	90.13
<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i> (ATCC=8293)	90.13
<i>Leuconostoc holzapfelii</i> (DSM=21478)	90.09
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (ATCC=12291)	89.94
<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i> (ATCC=19254)	89.92
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> (DSM=15947)	89.90
<i>Leuconostoc gelidum</i> (ATCC=49366)	89.89
<i>Leuconostoc kimchii</i> <AF173986>	89.84
<i>Leuconostoc carnosum</i> (ATCC=49367)	89.47
<i>Leuconostoc citreum</i> (ATCC=49370)	89.45
<i>Leuconostoc inhae</i> (DSM=15101)	89.28
<i>Leuconostoc lactis</i> (DSM=8581)	89.05
<i>Fructobacillus fructosus</i> (ATCC=13162)	88.88
<i>Fructobacillus durionis</i> <AJ780981>	88.71
<i>Leuconostoc fallax</i> (DSM=10614)	85.17
<i>Weissella ghanensis</i> <AM882997>	80.41

&lt;&gt;内はGenBank accession numberを示した。

表-6 分離菌bの同源性検索結果

菌種	% Match
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (ATCC=12291)	100.00
<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i> (ATCC=19255)	99.39
<i>Leuconostoc mesenteroides mesenteroides</i> (ATCC=8293)	99.39
<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i> (ATCC=19254)	99.18
<i>Leuconostoc gelidum</i> (ATCC=49366)	97.32
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> (DSM=15947)	97.09
<i>Leuconostoc holzapfelii</i> (DSM=21478)	96.97
<i>Leuconostoc lactis</i> (DSM=8581)	96.74
<i>Leuconostoc kimchii</i> <AF173986>	96.49
<i>Leuconostoc citreum</i> (ATCC=49370)	96.49
<i>Leuconostoc carnosum</i> (ATCC=49367)	96.48
<i>Leuconostoc inhae</i> (DSM=15101)	96.47
<i>Leuconostoc palmae</i> <AM940225>	95.38
<i>Fructobacillus ficulneus</i> <AF360736>	91.01
<i>Fructobacillus tropaeoli</i> <AB542054>	90.45
<i>Fructobacillus pseudoficulneus</i> <AY169967>	89.81
<i>Fructobacillus fructosus</i> (ATCC=13162)	87.99
<i>Fructobacillus durionis</i> <AJ780981>	87.35
<i>Leuconostoc fallax</i> (DSM=10614)	86.54
<i>Listeria grayi</i> (ATCC=19120)	81.66

&lt;&gt;内はGenBank accession numberを示した。

表-7 分離菌cの同源性検索結果

菌種	% Match
<i>Candida zemplinina</i> <AY160761>	100.00
<i>Candida davenportii</i> <AJ310447>	95.44
<i>Starmerella meliponinorum</i> <AF313354>	95.12
<i>Candida stellata</i> (ATCC=10673)	94.19
<i>Candida bombi</i> (ATCC=18811)	92.26
<i>Candida riocensis</i> <AY861674>	91.10
<i>Candida apicola</i> (ATCC=24617)	90.81
<i>Starmerella bombicola</i> (ATCC=22214)	89.61
<i>Candida etchellsii</i> (ATCC=60119)	88.77
<i>Metschnikowia bicuspidata</i> var. <i>bicuspidata</i> (ATCC=22297)	64.28
<i>Candida intermedia</i> (ATCC=14439)	62.31
<i>Candida pseudointermedia</i> (ATCC=60126)	61.97
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> (ATCC=24178)	56.17
<i>Ogataea minuta</i> (ATCC=16760)	55.73
<i>Ogataea deakii</i> <GQ265921>	53.94
<i>Ogataea angusta</i> (ATCC=14755)	51.90
<i>Ogataea pignaliae</i> (ATCC=36592)	51.42
<i>Candida Ilanquihuensis</i> (ATCC=58894)	50.18
<i>Ogataea pini</i> (ATCC=76276)	49.11
<i>Pichia philodendri</i> (DSM=70276)	48.54

&lt;&gt;内はGenBank accession numberを示した。

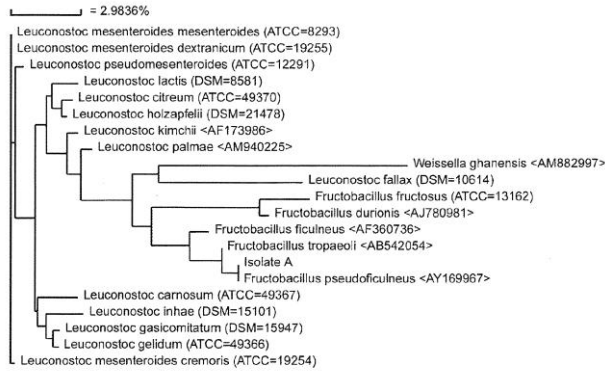


図-1 分離菌aとその近縁種の系統樹

Isolate A: 分離菌a

< >内はGenBank accession numberを示した。

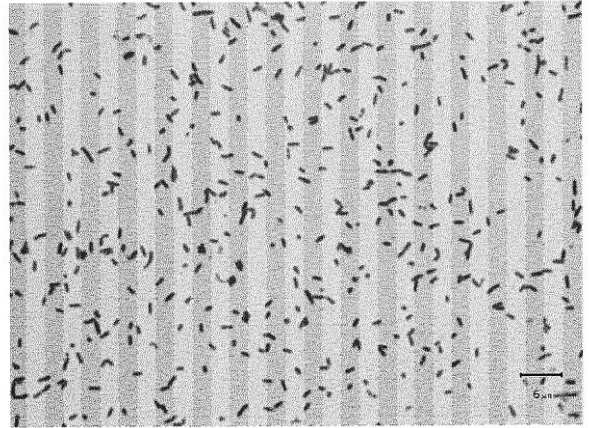


写真-2 分離乳酸桿菌の形態の一例

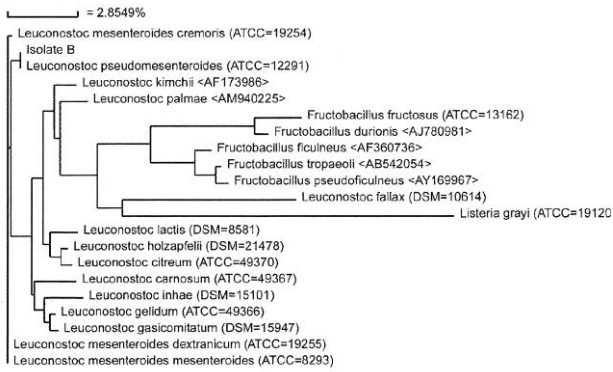


図-2 分離菌bとその近縁種の系統樹

Isolate B: 分離菌b

< >内はGenBank accession numberを示した。

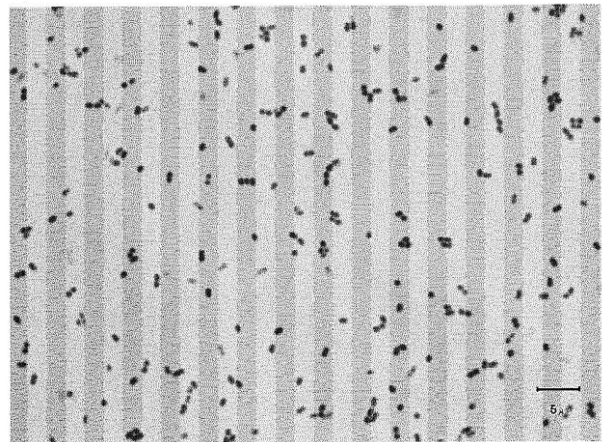


写真-3 分離乳酸球菌の形態の一例

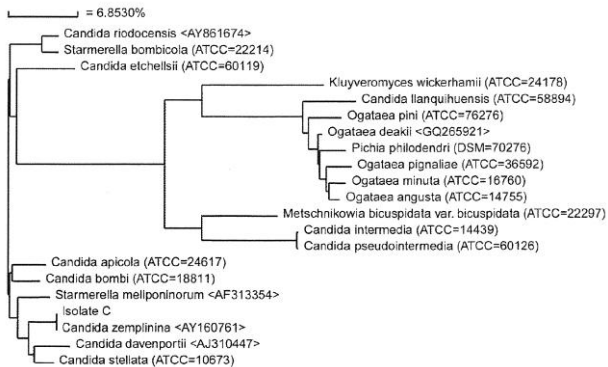


図-3 分離酵母とその近縁種の系統樹

Isolate C: 分離菌c

< >内はGenBank accession numberを示した。

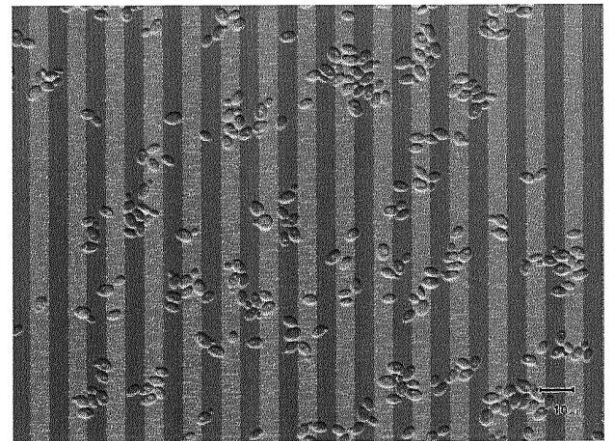


写真-4 分離酵母の形態の一例

YM 液体培地, 25°C, 1 日間培養

Fructobacillus とは果物、花などからの分離例がある乳酸桿菌で、2008 年に Endo らによって Leuconostoc から移行した属である。F. pseudoficulneus も 2008 年に Endo らによって

Leuconostoc から移行した属であり、果物からの分離例がある。

Leuconosto はグルコースからガスを生成する乳酸球菌で、植物、牛乳、乳製品から分離される。また、Leuconosto の中には粘性物質を生成し、畜肉加工品や魚肉加工品においてネトを発生させる菌種や、豆腐の黄変の原因となる菌種も知られている。アケビ発酵液自体にも同様のネトは頻出するため、同菌が作用している可能性は高い。

一方 *L. pseudomesenteroides* は食品、臨床材料からの分離例がある。

*Candida* は子嚢菌酵母で有性生殖は見られない種である。栄養細胞は主として球形、楕円形、円筒形、伸長形となり、多極出芽で増殖し、射出胞子を形成しない。自然界に広く分布し、土壌、大気、水などの一般環境や植物、食品の他ヒトを含む動物からも分離例が知られている。一方、*C. zemplinina* はワインの発酵過程からの分離例がある。

アケビ発酵液分析の結果、*Fructobacillus pseudoficulneus* (果実、花などからの分離例がある乳酸桿菌で 2008 年に Endo ら<sup>3)</sup> により同定)、*Leuconostoc pseudomesenteroides* (グルコースからガスを生成する乳酸球菌で植物、牛乳、乳製品から分離)、*Candida zemplinina* (ワインおよびワインの発酵過程からの分離例がある) が検出された。アケビ発酵液は二酸化炭素発生力が強いことがこれまでの経験から判明していたが、本細菌叢はこのことを裏付ける結果であった。

アケビ発酵液は固有の乳酸菌を中心とした細菌叢を持つユニークな素材であることが今回の研究で明らかとなった。農業資材として用いた場合に観察される強い抗菌力は固有の乳酸菌や酵母による可能性も見いだせた。食用への応用としてはその旺盛な二酸化炭素発生力を利用し、製パン資材としての応用も可能性が高い。今後も継続して細菌叢を明らかにし、アケビ発酵液を多分野に応用可能な新素材として提案していきたい。

## 謝辞

研究を進めるに当たり、多額の資金を助成してい

ただいた公益財団法人ウエスコ学術振興財団に謝意を表します。

## 参考文献

1. アケビ果実の成長に伴う果肉組織の形態的变化  
Anatomical and Histological Changes of the Pulp Tissue in Developing Akebi (*Akebia pentaphylla*) Fruit, 葉麗紅, 宋陽, 中尾 義則, 新居 直祐,  
名城大学農学部学術報告 = Scientific reports of the Faculty of Agriculture, Meijo University (48), 1-5, 2012-03
2. 山形県におけるアケビの最新動向 (特集 特産果樹をめぐる最近の動き), 金田 紀子, 果実日本 68(12), 47-50, 2013-12
3. Endo, A. and Okada, S.: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 58, 2195-2205 (2008)