

テンペ発酵菌 *Rhizopus* はどこからきたか—その生態

梶 啓介^{*}、徳増征二^{**}、今野 宏^{***}

^{*} 東京農業大学総合研究所 (東京都世田谷区桜丘)

^{**} 筑波大学菅平高原実験センター (長野県真田町菅平)

^{***} (株)真菌類機能開発研究所 (秋田県仙北郡刈和野)

(要旨)

インドネシアではテンペ製造に古来、ハイビスカスの緑葉がウサル (*usar*) と呼ばれるスターターとして用いられているが、テンペ発酵の主要微生物である菌類 (*Rhizopus oligosporus*) は従来このハイビスカスに自然に付着しているものと思われており、それ以上の両者の生態的関連性に関しては殆ど知られていない。今回、そのウサルおよび新鮮ハイビスカスの緑葉から洗浄法による菌類分離を試みたところ、100%に近い分離頻度で *Rhizopus* 属菌の発生が見られた。この結果、テンペ発酵菌である *Rhizopus* ならびに関連菌が単にハイビスカスの葉面に付着しているばかりではなく緑葉内生菌としても存在している可能性の高いことを示した。

(緒言)

東南アジアはカビ文化圏といわれる。各地域・各民族は微生物そのものを知らずとも、習慣的に技術を応用して彼等の食を支えている特有の産物をつくりだした。それが伝統発酵食品である。日本の伝統発酵食品を支えている麹の元となるコウジキン (*Aspergillus oryzae*) の原点は稲麹であるといわれているが、インドネシアの代表的伝統発酵食品であるテンペの発酵菌の *Rhizopus* の原点はどこにあるのであろうか。1984年に梶が最初にインドネシアで伝統的なテンペ製造工場を見学した際に、用いられていたスターターがハイビスカス (*Hibiscus*) の葉でつくられていることを見て疑問を感じたのが今回の研究の端緒である。数あるインドネシア植物のなかで何故にハイビスカス (オオハマボウ) がテンペ製造のスターターを作る上に選択されたのか、ハイビスカスとテンペ製造の主要発酵菌である *Rhizopus* との因果関係はどこにあるのか。この疑問は1996年に入手した乾燥ウサルの菌学的検討を筑波大学菅平センターで行った結果から、*Rhizopus* がハイビスカスの緑葉内部に何らかの状態で存在しているのではないかという研究方向へと発展したものである。更にハイビスカスと *Rhizopus* との共存関係があるとすれば、それはオオハマボウ、ハマボウ以外のフヨウ属植物にも発展しているのか、植物分布と *Rhizopus* の分布に相関関係があるのか、などの点に関して本研究が進展する可能性を示すものである。

* 現。東京都世田谷区南烏山 2-32-27-213

(実験材料と方法)

1) 実験材料として用いたウサルは、今野が1995年にインドネシアのジョクジャカルタにて入手したものを2年間にわたり乾燥保存(4°C)していたもの、および椿が1997年のインドネシア・バリ島におけるテンペ国際会議(International Tempe Symposium "Reinventing The Hidden Miracle of Tempe")に参加発表した際にバリ島のテンペ工場にて入手した新鮮なものである。ハイビスクスの緑葉は同じくバリ島の工場近辺および同島海辺で自生していたオオハマボウ(*Hibiscus tiliaceus* L.)から採取したものである。更に、フヨウ属(*Hibiscus*)と*Rhizopus*分布との相関性を追及する目的で、対照としてインドネシア以外、本邦に分布しているハマボウ(*H. hamabo* Sieb. & Zucc.)試験緑葉を静岡県下田市大賀茂川河口(正木氏採集; 自生)および東京都八丈島(岩崎氏採集; 栽培)から入手して研究に供した。

2) 菌類の純粋分離培養は徳増が洗浄法にて実施した。すなわち、ウサルおよびハイビスクス緑葉から径6ミリの円形リーフディスクを各20個打ち抜き、その4個を各々キャップ付試験管に投入、洗浄液の滅菌表面活性剤水溶液(0.005%スルホ琥珀酸ジオクチルナトリウム)の20ccを注ぎ、試験管をフラッシュミキサーにて一分間振盪し、振盪終了後一分間静置して洗浄液を交換、この操作を3回行った後、洗浄液を滅菌水に変えて再び3回繰り返す、表面を洗浄した試料は滅菌濾紙上に一昼夜置いて余分な水分を取り去る。次に、この試料をコーンミール寒天平板上において室温に放置、培地に出現した菌類を分離培養して形態学および生理学的に検討して同定に供した。

3) ウサルならびにハイビスクス試験葉は凍結マイクローム(大和光機製)にて葉組織切片を作成し組織内部の菌類諸器官の観察に供した。

(結果)

1995年にインドネシアで入手、2年間の乾燥状態(4°C)を経た後に分離に供したウサル試料からの結果は次の表1のとおりである。

表1. 乾燥ウサル(1995)から出現した菌類とその頻度(%)

(菌名)	(頻度)	
<i>Rhizopus oligosporus</i>	90	頻度: 出現disk / 総disk
<i>Eusarium</i> sp.	50	
<i>Aspergillus</i> sp.	30	
<i>Curvularia</i> sp.	20	

表1のごとく、2年間も乾燥状態で保存してあったウサル内部から極めて高い出現頻度で *Rh. oligosporus* が得られたことは、乾燥に弱い同菌の胞子が単にウサル表面に付着し

て出現したものとは思わず、何らかの耐久器官のかたちで内部に存在していたことを示すものである。この結果、このテンベの Rhizopus は元来はハイビスクス緑葉の内生菌として自然界に分布している菌類ではないのかという仮定に到達するに至った。

次に本研究の材料となるバリ島にて採集した新鮮なウサルならびにハイビスクス緑葉の三つの分離材料は帰国後、筑波大学菅平高原実験センターにて同様な洗浄法による菌類分離操作に供され、その結果を次の表2で示す。

表2. 新鮮ウサルおよびハイビスクス緑葉から出現した菌類とその頻度 (%)

(試料)	(出現菌類)	(頻度)
バリ島ウサル (1997)	<u>Rhizopus</u>	100
	<u>Aspergillus</u>	60
	<u>Cladosporium</u>	20
	<u>Fusarium</u>	15
	<u>Curvularia</u>	10
	<u>Penicillium</u>	5
バリ島テンベ 工場緑葉 (1997)	<u>Rhizopus</u>	100
	<u>Aspergillus</u>	15
	<u>Penicillium</u>	15
	<u>Curvularia</u>	5
バリ島海浜 緑葉 (1997)	<u>Rhizopus</u>	95
	<u>Cladosporium</u>	60
	<u>Aspergillus</u>	10
	<u>Chaetomium</u>	5

以上の表2で示したごとく新鮮なウサルおよびウサル原料となるハイビスクス緑葉、ならびに離れた海浜の自生ハイビスクス(オウハマボウ)緑葉内部から Rhizopus がほぼ100%の高率で出現した。

凍結切片の観察により、ウサル葉内部組織中に多数の Rhizopus の厚膜胞子と思われる器官を認め、それ等は Rhizopus の寒天培養下で形成されたものと同様であったが、今後、更に詳細な切片観察ならびに染色観察をおこなう予定である。現在のところは、Rhizopus がハイビスクスの内生菌であるとすれば恐らくはこの耐久性の厚膜胞子の状態で存在し、長

期の乾燥状態にも耐えたもではないかと予想する段階にとどめておく。

以上はインドネシア産の材料であるが、上で述べたごとく比較対照の目的で実施した本邦産ハマボウから得られた結果を次の表3で示す。

表3。本邦産ハマボウ緑葉から出現した菌類とその頻度(%)

(試料)	(出現菌類)	(頻度)
静岡県下田市 緑葉	<u>Rhizopus</u>	100
	<u>Cladosporium</u>	95
	<u>Alternaria</u>	55
	<u>Cladosporium</u> (2)	25
	<u>Fusarium</u>	15
	<u>Curvularia</u>	5
	<u>Aureobasidium</u>	5
東京都八丈島 若葉	<u>Rhizopus</u>	45
	<u>Phoma</u>	90
	<u>Fusarium</u>	10
	<u>Penicillium</u>	20
	<u>Alternaria</u>	5
	<u>Cladosporium</u>	5
東京都八丈島 成熟葉	<u>Rhizopus</u>	30
	<u>Phoma</u>	65
	<u>Cladosporium</u>	50
	<u>Penicillium</u>	15
	<u>Fusarium</u>	5

表3で示したように、ハイビスクス属の北上にともない、伊豆半島南端の下田市および八丈島のハマボウの緑葉にも Rhizopus は高頻度に存在することが判明した。

以上の結果は、従来はバイオニア的な糖依存菌 (sugar fungi) であると思われていた Rhizopus が、一方ではハイビスクス属植物の内生菌でもあるという可能性をますます高くするものである。なお、バリ島試料からの分離株の大部分は R. oligosporus と思われるが、同種以外のものも含まれており、上記の本邦産ハマボウ全分離株と併せて、分類学

的研究の結果はあらためて報告する。

(考察)

現在までに得られた結果は上記の表でしめすごとくであり、ほぼ想定した *Rhizopus oligosporus* 近縁菌の自然界にける分布ならびに生態にかんする知見を得ることができた。なお、インドネシアのテンベ製造現地では、スターターが混合された大豆原料が発酵初期の段階でバナナ緑葉で充填する操作があるが、このバナナ緑葉と *Rhizopus* との関係も今後検討する予定である。

次にテンベ発酵菌としての *Rhizopus* は著名であるが、その主要菌である *Rh. oligosporus* については余り知られていないので分類学的位置について紹介しておく。本種は菌類の接合菌門 (Zygomycota)、ケカビ目 (Mucorales)、ケカビ科 (Mucoraceae)、クモノスカビ属 (*Rhizopus*) に含まれ、分類学的正当名は *Rhizopus microsporus* van Tieghem var. *oligosporus* (Saito) Schipper & Stalpers で、現在では便宜上、*Rh. oligosporus* の名がなお使われることも多い。元来は斎藤賢道博士が1905年に中国・広東の醸造工場から分離して命名した *Rhizopus oligosporus* Saito という種類が元となっている。その発表原論文はなかなか入手し難いので、斎藤博士による詳細な原図を参考に掲げておく。この図の5 (矢印) に描かれている厚膜胞子に注目いただきたい。ウサルの組織切片中に見られた細胞と酷似しているからである。ただ、インドネシアのGanjar博士によると (personal communication)、ハイビスク・ウサルから分離される *Rhizopus* は *Rh. oligosporus* 以外に何種かあるとのことであり、インドネシア材料からの分離株と共に本邦産ハマボウ *Rhizopus* 分離株にかんする比較分類学的検討ならびに生態、分布に関する研究も現在続行中である。



終わりに、1984年、最初にインドネシアのテンベ工場見学の機会を下された昭和女子大学、小崎道雄博士、本年のバリ島調査の援助を受けた常磐大学、加藤清昭博士、ウサ

ルなどの凍結切片作成に協力された日本大学薬学部の小川吉夫博士、ハマボウ試験薬を採取された正木、岩崎両氏に感謝申し上げます。

参考文献

- Saito, K., 1905. Rhizopus oligosporus, ein neuer technischer Pilz Chinas. Centbl. f. Bakt. Abt. II, 14: 623-627.
- Hesseltine, C. V. et al. 1963. Investigation of Tempeh, an Indonesian Food, in Development in Industrial Microbiology, Amer. Inst. Biol. Sci., vol. 4: 275-287.
- Schipper, M. A. A., 1984. A Revision of the genus Rhizopus. Studies in Mycology, CBS, no. 25, 34pp.

(本研究の一部は日本テンペ研究会, 1997 秋季例会、常盤大学、で発表したものである)