

水産発酵食品中の有用微生物に関する研究

(課題番号 09460094)

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))
研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 藤井建夫
(東京水産大学水産学部教授)

はしがき

【研究目的】

水産の発酵食品は原材料が発酵素材になりにくいことや産業上の比重が比較的小さいことなどのために、農産や畜産の発酵食品に比べて研究例は少なく、一部の製品を除いてはそこに関与する微生物の種類や役割などもほとんど知られていない。筆者らはこれまで、水産発酵食品のうち、くさや、塩辛、魚醤油などについて研究を進めており、くさやについてはくさや汁細菌相の解析、抗菌作用を有する細菌による保存性の付与、カビによるトリメチルアミンの除去、らせん菌とくさや汁成分の関係、ヒスタミン分解細菌の役割などを明らかにし、塩辛については古くから関心の的である熟成中の旨味生成に対する微生物の役割について検討した(資料1参照)。また魚醤油については細菌相の解析や腐敗における好塩菌の関与、乳酸菌の役割などについて調べ、飛鳥の魚醤油より新種の好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* を発見している。なお、これら研究の到達点と今後の課題については水産発酵食品に関する小著『塩辛・くさや・かつお節』(恒星社厚生閣) および『魚の発酵食品』(成山堂書店)として整理している。

本研究課題では上記の研究経過をふまえ、次の諸点について研究する。(1) くさや汁中らせん菌に関する分類学的研究; くさや汁中には特徴的な微生物としてらせん菌が観察されるが、本菌は分離・培養が困難なため詳細な知見がない。そこで先に開発した分離装置を用いて分離したらせん菌について、遺伝子手法によりその分類学的位置を明らかにする。(2) くさや汁中の優勢微生物群の解析; *in situ* PCR法により、従来分離・検出が困難であったくさや汁中の優勢菌群を把握する。(3) 塩辛熟成中における微生物の役割と食中毒菌の挙動に関する研究; 塩辛熟成中の有機酸蓄積における微生物の役割と、塩辛に接種した数種の食中毒菌の消長について調べる。(4) 塩辛中の球菌類の簡易判別法の検討; 塩辛中の優勢菌群である球菌類の簡易判別法について検討する。(5) フグ卵巣糠漬けの細菌相に関する研究; 塩蔵工程の優勢菌群である好塩偏性嫌気性細菌および糠漬け製造工程中の優勢菌群である好塩性乳酸菌の分類と分布について検討する。

【研究組織】

研究代表者: 藤井建夫 (東京水産大学水産学部教授)

【研究経費】

平成 9年度	6,100千円
平成10年度	4,800千円
平成11年度	1,500千円

計 12,400千円

【研究発表】

(1) 学会誌等

1. M. Satomi, B. Kimura, G. Takahashi, T. Fujii: Microbial diversity in kusaya gravy, *Fisheries Science*, 63, 1019-1023 (1997).
2. M. Satomi, B. Kimura, M. Hayashi, Y. Shouzen, M. Okuzumi, T. Fujii: *Marinospirillum* gen. nov., with description of *Marinospirillum megaterium* sp. nov., isolated from kusaya gravy, and transfer of *Oceanospirillum minutulum* to *Mrarinospirillum minutulum* comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 1341-1348(1998).
3. Yu-Ching Wu , B. Kimura, T. Fujii: Fate of selected food-borne pathogens during the fermentation of squid shiokara, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 40, 206-210 (1999).
4. T. Fujii, Yu-Ching Wu , B. Kimura: Production of organic acids by bacteria during the fermentation of squid shiokara, *Fisheries Science*, 65, 671-672 (1999).
5. T. Kobayashi, B. Kimura, T. Fujii: Strictly anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented herrings (Surströmming), *Int. J. Food Microbiol.* (Accepted).
6. Yu-Ching Wu , B. Kimura, T. Fujii: Comparison of three culture methods for the differentiation of *Micrococcus* and *Staphylococcus* in fermented squid shiokara, *Fisheries Science*, 66, 142-146 (2000).
7. T. Kobayashi, B. Kimura, T. Fujii: Differentiation of *Tetragenococcus* populations occurring in products and manufacturing processes of puffer fish ovaries fermented with rice-bran, *Int. J. Food Microbiol.* (Accepted).
8. T. Kobayashi, B. Kimura, T. Fujii: *Haloanaeroboim fermentans* sp. nov., a strictly anaerobic fermentative halophile isolated from fermented puffer fish ovaries , *Int. J. Syst. Bacteriol.*

(2) 口頭発表

1. 呉友欽, 木村凡, 藤井建夫：イカ塩辛熟成中の微生物相と有機酸蓄積, 平成9年度日本水産学会春季大会 (1997, 4).
2. 里見正隆, 保木本悟史, 木村凡, 藤井建夫：新規好塩性らせん菌の形態変化に及ぼす培養条件の影響、平成9年度日本水産学会春季大会 (1997, 4).
3. 藤井建夫：21世紀に生かす伝統食品の知恵, 全国伝統食品シンポジウム (日本発酵機構余呉研究所主催, 1997, 5).
4. 小林武志, 松尾たか子, 木村凡, 藤井建夫：数種水産発酵食品より分離された好塩偏性嫌気性細菌, 平成9年度日本水産学会秋季大会 (1997, 10).
5. 小林武志, 松尾たか子, 北条由香子, 霜田美栄子, 木村凡, 藤井建夫：水産発酵食品より分離された好塩偏性嫌気性細菌の種レベルでの分類, 平成10年度日本水産学会秋季大会 (1998, 9).
6. 呉友欽, 木村凡, 藤井建夫：イカ塩辛から分離した*Staphylococcus*及び*Micrococcus*の簡易分別法について, 平成11年度日本水産学会春季大会 (1999, 4).

7. 小林武志, 木村凡, 藤井建夫: フグ卵巣糠漬けの減毒における微生物の関与について, 日本食品衛生学会第77回学術講演会 (1999, 5).

(3)出版物

1. 藤井建夫: 伝統食品に見る微生物制御, in食品微生物制御技術の進歩 (日本食品保全研究会編), p. 92-104, 中央法規出版, 1998.
2. 藤井建夫: 水産製品, inバイオプリザーベーション-乳酸菌による食品微生物制御 (森地敏樹、松田敏生編), p. 80-90, 幸書房, 1999.
3. 藤井建夫: 魚の保蔵から生まれた発酵食品, 食品保蔵科学会誌, 25, 245-252 (1999).
4. 藤井建夫: 魚の発酵食品, pp. 160, 成山堂書店, 2000.

【研究成果の概要】

本研究では各種水産発酵食品のうち、くさや、イカ塩辛、フグ卵巣糠漬けに関する微生物学的課題について検討した。主要な成果は以下の通りである。

1. くさや汁中らせん菌に関する分類学的研究 (論文2参照)

くさや汁中の特徴的な細菌として、顕微鏡下で多数のらせん菌が観察されるが、これらの多くは分離・培養が困難であったためその性状については不明であった。本研究では、先に開発したらせん菌分離装置を用いて新島、大島等のくさや汁より分離した菌株について、表現形質 (形態、生化学性状、培養性状等)、化学性状 (菌体脂肪酸組成、細胞壁成分)、遺伝子性状 (DNAの塩基組成、DNA-DNAハイブリダイゼーション、制限酵素による16SrDNA切断パターン(RFLP)解析) を調べ、近縁種との系統解析を行った。

その結果、くさや汁からの分離らせん菌は大型で平板培地では増殖できず酸素濃度6%程度の微好気条件下でのみ増殖できる群と、小型で培養可能な群の2群に分かれたが、いずれも好塩性で、従来の分類では*Oceanospirillum*属に分類された。しかしいずれも表現形質では種レベルの分類的位置は特定できなかった。これらは16S rRNAおよびgyrase β サブユニット塩基配列を用いた系統解析および近縁種とのDNA-DNAハイブリダイゼーション等の結果から新属に該当すると考えられたので、新たに*Marinospirillum*属を提唱し、前者に*M. megaterium*と命名した。

2. くさや汁中の微生物相の解析 (論文1参照)

くさや汁中の脱窒、硝酸塩還元、硫酸塩還元、タンパク質分解、デンプン分解の各活性を有する菌群を計数した結果、窒素・硫黄の変換に関与する菌群が多数であるのに対し炭水化物分解菌は少数であった。またくさや汁の生菌数は $10^7 \sim 10^8$ /mlであるが、DAPI染色により直接計数すると 10^{11} /mlのいわゆるVBNC細菌が観察される。そこで、くさや汁より直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子塩基配列を解析して優

占菌群を検討したところ、*Bacteroides-Cytophaga*群, wall less spirohaeta群, Thermotogales, *Eubacterium*, *Paracoccus*など、これまで報告されていない未知の菌群と相同性の高い菌群が認められた。

3. 塩辛熟成中における微生物の役割と食中毒菌の挙動に関する研究 (論文3, 4参照)

塩辛(食塩10%)熟成中における微生物の役割を明らかにするため、抗生物質添加および非添加の塩辛を調整し、熟成中の有機酸量の変化を調べた結果、抗生物質非添加の塩辛でのみ乳酸が最大225mg/100g、酢酸が153mg/100g蓄積し、その生成には塩辛中の優勢菌群である*Staphylococcus*が重要であることが分かった。また塩辛の微生物学的安全性を確認するため、塩辛に数種の食中毒菌を接種してその消長を調べた結果、黄色ブドウ球菌は生残する可能性が示されたが、熟成期間中増殖はせず、エンテロトキシンも検出されなかった。腸炎ビブリオ、E型ボツリヌス菌は死滅し検出できなくなった。

4. 塩辛中の球菌類の簡易判別法の検討 (論文6参照)

塩辛熟成中の優勢菌群と考えられている*Staphylococcus*と*Micrococcus*属の簡易判別には従来O/F testが用いられてきたが、この方法には疑問が持たれたため、両属の標準菌株34株について検討した結果、OFテストは*Staphylococcus*の約1/2の菌種を誤って*Micrococcus*と判別することがわかり、両菌群はFP agar及びSK agarにより明確に判別できることが確認された。

5. フグ卵巣糠漬けの細菌相に関する研究 (論文5, 7, 8参照)

糠漬けに関する微生物学的知見が少ないため、製造過程の微生物相について検討した。その結果、塩蔵工程の優勢菌群として分離された好塩偏性嫌気性細菌は、酪酸、プロピオン酸産生菌群とエタノール産生菌群の2群に大別され、前者は*Haloanaerobium alcaliphilum*、後者は*Haloanaerobium*属の新種であることが判明し、*H. fermentans*と命名することを提唱した。また、糠漬け製造工程中の優勢菌群である好塩性乳酸菌は*Tetragenococcus halophilus*と*T. muriaticus*の2群に大別された。

なお、水産発酵食品における好塩偏性嫌気性細菌の分布を調べ、本菌群は糠漬けのほか、魚醤油、くさや汁、スウェーデンのニシン発酵缶詰 (Surströmming)にも広く分布していることを明らかにした。