水産発酵食品中の乳酸生成菌に関する研究

（課題番号 13460090）

平成 13 年度～平成 15 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 16 年 3 月

藤井　建夫

（東京海洋大学 海洋科学部 教授）

はじめに

【研究目的】

農産や畜産の分野では、これまで発酵食品に関する研究が活発に行われてきており、それぞれの食品毎に製造に関与する微生物の種類や発酵の仕組み、品質劣化の要因などについての厖大な研究の蓄積がある。これらの発酵食品では乳酸菌が主要な役割を果たしている場合が多いが、水産の発酵食品については従来研究例は少なく、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についてはほとんど知られていない。また魚肉自体に糖質が少ないために、漬け物型発酵製品（ふなずし、馴れずしなど）を除いては、乳酸菌に関心が持たれることもほとんどなかった。

筆者はこれまで、水産発酵食品のうち、クサヤ、塩辛、魚醤油等について研究を進めてきた。クサヤについてはその保存性の原因解明や新属螺旋菌（*Marinospirillum* gen. nov.)の発見などを行い、塩辛については熟成中の旨みとにおい生成における微生物の役割を明らかにした。また魚醤油については腐敗における好塩菌の関与などを明らかにした。また、飛島の魚醤油では乳酸菌が腐敗防止に貢献していることや、塩辛の熟成中にも乳酸の蓄積が見られることなどから、水産発酵食品においても乳酸生成菌の関与があることを見いだした。

そこで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を行う。（1）飛島の魚醤油では乳酸菌が存在し、最終製品である塩辛の保存性に寄与していることを明らかにしているので、本研究では熟成中における細菌相の変化とヒスタミン蓄積の関係などについて調べる。(2) 魚醤油中好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* について、ヒスタミン生成に及ぼす各種条件（食塩濃度、pH、グルコース濃度、好気嫌気条件など）の影響およびヒスチジン脱炭酸酵素の酵素・遺伝子性状を調べる。(3) 水産発酵食品のうち微生物学的な情報の少ないふなずしについて、製品および熟成過程の細菌相変化を調べる。(4) クサヤ汁の優勢菌群は培養困難であるので、その微生物群の解明は困難であった。本研究では微生物群集の遺伝子解析によりそれらの主組成を明らかにする。

【研究組織】

研究代表者：藤井建夫（東京海洋大学海洋科学部(東京水産大学水産学部)教授）

【研究経費】

平成 13 年度	7,500 千円
平成 14 年度	3,100 千円
平成 15 年度	2,700 千円
計	13,300 千円

【研究発表】

(1) 学会誌等

1. B. Kimura, Y. Konagaya, T. Fujii: Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce, Int. J. Food Microbiol., 70 (1-2), 71-77 (2001).
2. M. Satomi1, B. Kimura1, T. Hamada, S. Harayama, T. Fujii: Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and *gyrB* genes: Emended description of the genus *Oceanospirillum* and *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov., and *Terasakiella* gen. nov.; transfer of *Oceanospirillum jannaschii*, and *Pesudomonas stanieri* to *Marinobacterium* with *Marinnobacterium jannaschii* comb. nov., and *Marinobacterium stanieri* comb. nov., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 739-747 (2002).
3. Y. Konagaya, B. Kimura, M. Ishida, T. Fujii: Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium, J. Appl. Microbiol., 92, 1136-1142 (2002).
4. H.Takahashi, B. Kimura, M. Mori, T. Fujii: Analysis of bacterial communities in *kusya* gravy by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified DNA fragments, Japan. J. Food Microbiol., 19 (4), 179-185 (2002).
5. H. Takahashi, B. Kimura, M. Yoshikawa, T. Fujii: Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase gene of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish, Appl. Environ. Microbiol., 69 (5), 2568-2579 (2003).
6. M. Satomi, B. Kimura, M. Hayashi, M. Okuzumi, T. Fujii: *Marinospilillum insulare* sp. nov., a novel halophilic helical bacterium isolated from kusaya gravy, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 163-167 (2004).
7. Y. Konagaya, B. Kimura, T. Tomiuka, S. Hokimoto, T. Fujii: Acid Inducible Histidine Decarboxylase Gene from *Tetragenococcus muriaticus*, a Halophilic Lactic Acid Bacterium (in press).

(2)口頭発表

1. 小長谷幸史・木村 凡・木原航平・藤井建夫：好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* のヒスタミン生成に及ぼす培養条件の影響，平成 12 年度日本水産学会秋季大会，2000 年 10 月(福井).
2. 小長谷幸史・木村 凡・石田真巳・藤井建夫：好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* のヒスチジン脱炭酸酵素の精製および性状，平成 13 年度日本水産学会春季大会 ，2001 年 4 月（藤沢）
3. 高橋 肇・森 真由美・木村 凡・藤井 建夫：16S rDNA 多型解析法によるくさや汁のミクロフローラ解析，平成 13 年度日本水産学会春季大会，2001 年 10 月(藤沢）.

4. 後藤清太郎・中辻美樹・渡辺 至・木村 凡・川崎 晋・藤井建夫：食肉製品製造工場における変敗乳酸菌 *Leuconostoc* 属の PCR 検出，第 83 回日本食品衛生学会学術講演会，2002 年 5 月（東京）．
5. 藤井建夫：アレルギー様食中毒について、第 23 回日本食品微生物学会学術総会、2002 年 9 月（東京）
6. 高橋 肇・木村 凡・吉川美和子・藤井建夫：PCR-SSCP 法によるヒスタミン生成菌の検出・同定システムの開発，第 84 回日本食品衛生学会学術講演会，2002 年 10 月(大阪)．
7. 森真由美・木村 凡・高橋 肇・藤井建夫：PCR-SSCP 法による鮮魚の細菌フローラの解析，第 84 回日本食品衛生学会学術講演会，2002 年 10 月（大阪）．
8. T. Fujii: Microbial Contributions in Japanese Fermented Seafoods (Keynote Lecture), DGHE-JSPS International Workshop on Processing of Fisheries Products, 2003 年 8 月(インドネシア).
9. 高橋 肇・木村 凡・藤井建夫・後藤清太郎・渡辺 至：PCR-DGGE 法を用いた食肉変敗菌の検出同定法の確立，第 24 回日本食品微生物学会学術総会，2003 年 9 月（岡山）．

(3)出版物

1. 藤井建夫:魚の発酵食品，成山堂書店，2000.
2. 奥積昌世，藤井建夫編:イカの栄養・機能成分（分担執筆），成山堂書店，2000.
3. 竹内昌昭，藤井建夫，山澤正勝編:水産食品の事典（分担執筆）,朝倉書店，2000.
4. 石田祐三郎・杉田治男編:海洋環境アセスメントのための微生物実験法（分担執筆），恒星社厚生閣, 2000
5. 芝崎勲監修:有害微生物管理技術 1 巻（分担執筆），フジテクノシステム，2000.
6. 藤井建夫，山中英明編：HACCP と水産食品（分担執筆），恒星社厚生閣，2000.
7. 有馬和幸，藤井建夫，高鳥直樹編：水産食品 HACCP の基礎と実際（分担執筆），NTS, 2000.
8. Okuzumi, Fujii 編：Nutritional and Functional Properties of Squid and Cuttlefish（分担執筆）, National Cooperative Association of Squid Processors, 2001.
9. 藤井建夫編:食品の保全と微生物（分担執筆），幸書房, 2001.
10. 藤井建夫:増補 塩辛・くさや・かつお節ー水産発酵食品の製法と旨味，恒星社厚生閣，2001.
11. バイオインダストリー協会/発酵と代謝研究会編:発酵ハンドブック（分担執筆），共立出版, 2001.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (2nd ed.)（Genus *Marinospirillum* 分担執筆）, Springer, 2001.
13. 吉沢 淑，石川雄章，蓼沼 誠，長沢道太郎: 永見憲三編:醸造・発酵食品の事典(分担執筆)，朝倉書店, 2002.
14. 食品加工総覧（分担執筆），農文協，2002.
15. 藤井建夫: 食品微生物標準問題集，幸書房，2002.

16. 熊谷 進, 小久保彌太郎, 小沼博隆, 豊田正武編： HACCP=衛生管理計画の作成と実践,改訂データー編（分担執筆）， 中央法規， 2003.
17. 日本熱帯農業学会編: 熱帯農業事典（分担執筆)、養賢堂, 2003.
18. 東 和男編：発酵と醸造（分担執筆），光琳, 2004.
19. 食品衛生研究会監修：食品衛生責任者ハンドブック（分担執筆)、日本食品衛生協会 2004.
20. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3 (2nd ed.) (Genus *Tetragenococcus* 分担執筆）, Springer, 2004 (in press).

【研究成果の概要】

（1）魚醤油中乳酸菌の消長と成分変化：飛島の魚醤油の製造工程は複雑であるが、魚醤油の熟成工程の初期（11 月)、中期（6 月)、後期（11 月)にサンプリングを行い、それらについて微生物学的分析（乳酸菌、好塩菌などの生菌数、フローラなど）および化学分析を行った。10%または 20%食塩加培地での生菌数は初期の 10^6/g から中期には 10^8/g に増加した。発酵後期の魚醤油は pH5.5、食塩濃度 20.7%、VBN181mg/100g、乳酸 1,620mg/100g、グルタミン酸 1,322mg/100g、ヒスタミン 163mg/100g であった。熟成中の優勢菌群は *Tetragenococcus halophilus* で、ほかに *Bacillus* や *Micrococcus* がみられた。また初期にはヒスタミン生成能を有する *T. muriaticus* も検出された。

(2) 魚醤油中好塩性乳酸菌によるヒスタミン生成条件：魚醤油から分離された好塩性乳酸菌 *T. muriaticus* について、ヒスタミン生成に及ぼす各種条件（食塩濃度、pH、グルコース濃度、好気嫌気条件など）の影響を調べた。本菌の増殖細胞によるヒスタミン生成は酸性（pH 5.8)、嫌気条件下で高く、至適食塩濃度は 5～7 %であったが、20%でも生成がみられた。またヒスタミン蓄積は増殖の定常期後期で大きかった。上記ヒスタミン生成の至適条件は cell suspension の実験でも同様の傾向がみられた。

(3) 好塩性乳酸菌 *T. muriaticus* のヒスチジン脱炭酸酵素の性状：*T. muriaticus* のヒスチジン脱炭酸酵素を精製し、そのタンパク性状および N-末端アミノ酸配列を調べた。精製酵素は pH 4.5～7.0 の幅広い範囲で高い活性を示し、pH 4.5 で最も安定であった。熱安定性試験の結果 pH4.5 で40℃ 20分間は安定であり、80℃ 以上では完全に失活した。反応最大速度（Vmax）は 16.8 μmol histamine/min mg、ミカエリス定数（Km)は 0.74 mM であった。また本酵素は 28.8 kDa（α）および 13.4 kDa（β）の 2 つのサブユニットから形成され、未変性の状態では 258 kDa のタンパクであることが示されたことから、$(\alpha\beta)_6$ の 12 量体の構造をとることが推察された。これらの性状は他のグラム陽性細菌のヒスチジン脱炭酸酵素の性状と類似していた。N-末端アミノ酸配列の結果 *Oenococcus oeni* のヒスチジン脱炭酸酵素と α および β サブユニットともに完全に一致し *Lactobacillus buchneri* とも非常によく類似していた。

(4) *T. muriaticus* のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子のクローニング、配列決定および発現: *T. muriaticus* の染色体 DNA を抽出し *Eco*RI 断片のうち 2.4 kbp のものを pUC 18 にクローニングし、このプラスミドを pE38 とした。得られた pE38 の挿入配列を配列決定に供した結

果 2 つのオープンリーディングフレームが見いだされ、上流側のものを *hdcA*, 下流側のものを *hdcB* とした。このうち *hdcA* はG+C 含量が *T. muriaticus* の染色体DNA より5% 高い41% であり、約 34 kDa のタンパクをコードし、演繹アミノ酸配列は *O. oeni* のヒスチジン脱炭酸酵素と約 98%一致していた。この演繹アミノ酸配列のうちβ サブユニットと推定される領域と既知のヒスチジン脱炭酸酵素のβ サブユニットにより系統樹を作製した結果、Stiles および Holzapfel (1997) の報告した 16S rDNA の配列による系統樹と異なる結果が得られた。サブクローニング後に *hdcA* を *E. coli* で大量発現させた結果得られたタンパクは 35 kDa のタンパクであり、不溶性の封入体を形成していた。この封入体を可溶化しリフォールディングを行った結果、活性のあるタンパクが得られた。ノーザンハイブリダイゼーションにより発現を調べた結果約 1 kb の転写産物が低 pH 半嫌気条件下で培養した定常期の細胞から顕著に見られた。また *hdcA* と *hdcB* はそれぞれ単独に発現している可能性が強く示唆された。

以上の(3),(4)の結果から *T. muriaticus* のヒスチジン脱炭酸酵素は性状やアミノ酸配列など他のグラム陽性細菌のヒスチジン脱炭酸酵素と非常に類似した酵素であることが示された。

(5) くさや汁中の培養困難な優勢菌群：新島のくさや加工場より採取したくさや汁中の微生物相を PCR-RFLP および PCR-DGGE 法により解析した。平板培地で測定した生菌数は TSA 培地、BP_5G 培地、ABCM 培地上で 1.2×10^8～1.5×10^9 であった。それぞれのくさや汁より 40 菌株を分離し PCR-RFLP 法を用いて群分けしたところ、分離菌株はそれぞれ 6～9 群に分けられた。各群の代表株を 16SrDNA の塩基配列より同定した結果、*Pseudomonas, Marinobacter, Peptostreptococcus, Enterococcus* などの属に該当した。くさや汁より直接 DNA を抽出し、PCR 増幅により得られた 16SrDNA を DGGE 解析に供したところ、3 種類のくさや汁で類似したパターンが認められた。ゲル中より主なバンドを回収してクローニングし、塩基配列に基づいて菌を同定した。その結果、*Bacteroides, Flavobacterium, Eggerthela lenta, Clostridium* 属に該当した。培養法により分離された菌群と PCR-DGGE 法によって解析された菌群には大きな違いがあることが判明し、くさや汁中には培養できない菌群が存在していると考えられた。

(6) ふなずしの乳酸菌フローラ：ふなずし市販品のフローラは *Lactobacillus kefir, L. alimentarius* が優勢であった。現地（滋賀県）加工場で米飯漬け込み中の各時期の試料について調べた結果、漬け込みの前半にフローラの変動が大きく、初期に優勢であった好気性菌が淘汰され、乳酸菌が優占した。乳酸菌は漬け込み初期には *L. alimentarius* が、後期には *L. kefir* が優勢となった。