

---

馴れずし乳酸菌群のDGGE法等による解析と  
エクオール産生乳酸菌の食歴解明

---

16380143

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B))研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 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、これまで味噌、醤油、納豆、清酒、ヨーグルトなど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膨大な研究の蓄積がある。農産や畜産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などのために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。また水産発酵製品ではこれまで乳酸菌に関心が持たれることもほとんどなかった。

申請者はこれまで、水産発酵食品のうち、クサヤ、塩辛、魚醤油、糠漬け等について研究を進めており、その成果の概要は啓蒙の目的も兼ねて、「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）として上梓している。クサヤについてはクサヤ汁成分と微生物相の解明、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、新規大型螺旋菌の分離・同定、ヒスタミン分解細菌の存在などを明らかにし、塩辛については古くから関心の的である熟成中の旨みとおい生成における微生物 (*Staphylococcus*) の役割について検討した。また魚醤油については腐敗における好塩菌の関与、好塩性乳酸菌のヒスタミン生成とヒスチジン脱炭酸酵素の性状解明などについて調べ、糠漬けについてはそのフローラや微生物によるフグ毒分解について検討している。

そこで、本研究課題では上記の研究経過から、水産発酵食品中で最も微生物作用が顕著であるにもかかわらず、これまで研究がほとんど行われていない馴れずし(特にふなずし)に焦点を絞り、次の諸点について調べた。(1) SSCP 法を併用したふなずし製造過程の微生物フローラの解明：ふなずしの米飯漬け込み期間中(1年間)におけるフローラ変化を解明するために、細菌、酵母分離株の DNA を抽出し、それぞれ 16S rDNA、18S rDNA 領域を PCR 増幅、SSCP 法により群分けし、各代表株の rDNA 塩基配列を決定し DDBJ のデータベースと相同性検索を行い同定する。(2) 非培養型 DGGE 法によるフローラ解析：上記試料から直接細菌 DNA を抽出し、PCR-DGGE 法等の遺伝子手法を導入して培養困難な微生物群集も含めたフローラ解析を行う。(3) 馴れずしの製造における糖化微生物の解明等：従来馴れずしの乳酸菌はデンプンの糖化能を有しないので、糖化に関与する微生物について解明する。(4) 馴れずしにおける *Lactococcus gravieae* の検索：*L. gravieae* は前立腺がんのリスク軽減作用のあるエクオール生成能を有する乳酸菌として注目されているが、一方養殖魚の病原菌としても知られるので、その食歴(馴れずし中の分布)を解明する。

### 【研究組織】

研究代表者：藤井建夫（東京海洋大学海洋科学部教授）

## 【研究経費】

|        |                  |
|--------|------------------|
| 平成16年度 | 9,800千円（間接経費 0円） |
| 平成17年度 | 5,600千円（間接経費 0円） |
| -----  |                  |
| 計      | 15,400千円         |

## 【研究発表】

### (1) 学会誌等

1. S. Goto, H. Takahashi, S. Kawasaki, B. Kimura, T. Fujii, M. Nakatuji, I. Watanabe: Detection of *Leuconostoc* strains at a meat processing plant using polymerase chain reaction. J. Food Hyg. Soc. Japan, 45, 25-28, 2004.
2. H. Takahashi, B. Kimura, M. Yoshikawa, S. Goto, I. Watanabe, T. Fujii: Direct detection and identification of lactic acid bacteria in a processing plant and in meat products using denaturing gradient gel electrophoresis, Journal of Food Protection, 67, 2515-2520 (2004).
3. S. Handa, B. Kimura, H. Takahashi, T. Koda, K. Hisa, T. Fujii: Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores, Journal of Food Protection, 68, 411-415 (2005).
4. Y. Kasai, B. Kimura, S. Kawasaki, T. Fukuya, K. Sakuma, and T. Fujii: Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere, J. Food Prot., 68, 1005-1011 (2005).

### (2) 口頭発表

1. 渡辺祥子、木村 凡、堀越昌子、藤井建夫：PCR-DGGE法を用いたふなずし熟成過程におけるフローラ解析、第25回日本食品微生物学会学術総会（2004.9.29）

### (3) 出版物

1. 藤井建夫：醸造と発酵Ⅲ（東 和男編）、光琳（2004.4.20）
2. 藤井建夫、森真由美：全国水産加工品総覧（山澤、福田、岡崎編）、光琳（2005.6.30）
3. 藤井建夫：魚の科学事典（谷口透，中坊徹次，宗宮弘明，谷口旭，青木一郎，日野明德，渡邊精一，阿部宏喜，藤井建夫，秋道智美彌 編）、朝倉書店（2005.11.25）
4. 藤井建夫：魚介類の発酵食品、食の文化サロン開催記録 No. 3（2005.7.）
5. LEON M. T. DICKS, WILHELM. H. HOLZAPFEL, MASATAKA SATOMI, BON KIMURA, and TATEO FUJII : *Tetragenococcus Collins et al. 1990*, Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, Springer (in press)

## 【研究成果の概要】

### 1. ふなずし熟成中の乳酸菌フローラ解析

ふなずしの微生物作用を明らかにするために、ふなずし熟成過程（1年間）における微生物フローラの変遷を培養法および非培養法（PCR-DGGE法）によって解析し、あわせて生菌数、pH、有機酸量などについても測定した。

まず、ふなずし熟成過程のpH、生菌数、乳酸菌数などの変化について調べた結果、熟成中の生菌数は漬け込み開始時の $10^2$  cfu/gから、3日目には $10^8$  cfu/gと急激に増加、14日目以降緩やかに減少し、1年後には $10^4$  cfu/g程度となった。NaCl濃度は、7日目より魚肉、米飯ともに4%前後で安定し、pHは米飯では14日目までに急激に低下、魚肉では7日目以降に減少し、米飯、魚肉ともに30日目にはpH4以下となり安定した。乳酸量は7日目から30日目にかけて急増し、1年後には1,500mg/100gに達した。

次に、上記試料中より分離した菌株についてフローラ解析を行った。分離菌株をまずPCR-SSCP法に供して群別した結果、細菌は13群、酵母は7群に分けられた。細菌は、16S rDNA塩基配列による同定の結果、漬け込み開始から7日目まで*Staphylococcus*属が優勢であり、14日目から90日目以前までは*Lactobacillus plantarum*が、以降は*L. parakefiri*が優勢となった。また90日目から*Bacillus*属が検出されるようになった。酵母に関しては16S rDNA塩基配列による同定の結果、漬け込みから7日目まで*Rhodotorula mucilaginosa*、*Rhodosporidium diovatum*、*Candida parapsilosis*が検出されたが、14日目と30日目の検体からは*C. parapsilosis*のみ、それ以降は*C. versatilis*のみが検出された。

熟成過程において、乳酸菌の増殖に必要なデンプン分解能（グルコースの生成）は初期に存在が確認された*Bacillus*属株に強い活性が示されたことからこれらの作用が大きいと考えられた。

また、PCR-DGGE法によるフローラ解析の結果、熟成初期には*Staphylococcus*属を始めとする多様な細菌群が存在しており、7日目までのバンドパターンは大きく変動していた。ふなずしの優勢菌と考えられる乳酸菌は、7日目から検出され始め、熟成過程を通して*Lactobacillus plantarum*、7日目から14日目までは*L. curvatus*、90日以降には*L. acetotolerans*と相同性の高いバンドが検出された。乳酸菌の増殖に伴うpHの低下、有機酸の増加、微生物相の安定化が観察された。

市販ふなずしについてPCR-DGGE解析を行った結果、*L. acetotolerans*と相同性の高いバンドが高頻度で検出され、製造場所や製造法の違いに関わらず、ふなずしに広く存在する優勢菌であることが示された。なお、*L. acetotolerans*またはそれと類似の細菌はふなずしから分離された報告例がなく、本研究において初めて優勢菌として確認された。

### 2) 馴れずしにおける*Lactococcus garvieae*の探索

前立腺がんのリスク軽減や骨粗しょう症の予防に有効性が期待されているエクオール<sup>®</sup>の産生菌として注目される*Lactococcus garvieae*の食歴（安全性の傍証）を明らかにするため、上記ふなずしおよび別途入手したその他の馴れずし計60試料における本菌の分布をPCR法により調べた。その結果、これら試料からは*L. garvieae*は検出されなかった。