

## 9453 いか塩辛熟成中の耐塩性および好塩性細菌フローラの検討

助成研究者：藤井 建夫（東京水産大学 水産学部）

共同研究者：木村 凡（東京水産大学 水産学部）

## 1. 目的

塩辛は最も代表的な水産発酵食品であり、これまでもいくつかの研究があるが、そこにおける微生物の役割については明確な結論が出されていないのが実状である。最近、著者らは熟成中のアミノ酸生成には細菌はほとんど関与していないことを明らかにし、微生物はむしろ塩辛の香気成分生成等に寄与しているであろうと推察しているが、これら微生物の役割を解明していくためには、そこに常在する微生物の種類（フローラ）を把握しておくことがまず重要となる。しかしこれに関する従来の研究では低塩分培地を用いたものが多く、食塩を10%程度以上含む塩辛中で増殖する耐塩性および好塩性の細菌フローラを正しく反映していない可能性がある。食塩を10%程度以上含む塩辛では、10%程度の食塩存在下で増殖できる細菌が重要と考えられるので、本研究では熟成中のフローラを、10%程度の食塩存在下で増殖可能な耐塩・好塩性細菌を中心に検討することとした。

## 2. 研究方法

スルメイカ（マイカ）を用い、5種の塩辛（食塩10%添加）を調製、20℃で熟成を行い、その際に出現する各種細菌群を、2.5%食塩加BPG培地（一般細菌用）および10%食塩加BPG培地（耐塩・好塩性細菌用）を用いて経時的に計数、分離した。合計約1000株の分離菌株について、形態、グラム染色、運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、糖発酵性等の性状に基づき属レベルの群別を行った。そのうちの1試料について、*Micrococcus*および*Staphylococcus*属と推察される菌群をさらにBaird-ParkerおよびBergey's Manualの方法にしたがって種レベルで同定を行った。

## 3. 結果と考察

イカ塩辛中の微生物叢は、製造直後には*Acinetobacter*、*Moraxella*、*Pseudomonas*属等のグラム陰性桿菌と酵母が多く見られたが、熟成が進むにつれ、*Staphylococcus*と*Micrococcus*属が優占菌群となる傾向を示した。これはイカ塩辛の食塩濃度が10%と高いために食塩耐性の低いグラム陰性桿菌がすみやかに減少し、比較的強い食塩耐性を有する*Staphylococcus*属等の球菌群が経時的に増加したためであると思われる。全分離菌株中における出現頻度は、*Staphylococcus*が約60%、*Micrococcus*が約26%を占め、両菌群がイカ塩辛中で約86%を占めた。*Staphylococcus*属は種レベルで7種に分類され、なかでも*S.warneri*と*S.haemolyticus*の2種で*Staphylococcus*属の約89%を占めた。また、*Micrococcus*属は種レベルで*M.varians*と*M.sedentarius*の2種に分類され、*M.varians*が*Micrococcus*属中の約86%を占めた。以上の結果より、塩辛における優占種として球菌数種が特定されたので、今後はこれら主要菌種を中心にその機能・役割の解明を進める予定である。



## 9453 いか塩辛熟成中の耐塩性および好塩性細菌フローラの検討

助成研究者：藤井 建夫（東京水産大学 水産学部）

共同研究者：木村 凡（東京水産大学 水産学部）

## 1. 目的

塩辛は最も代表的な水産発酵食品であるが、農産物の発酵食品に比べると研究はきわめて少なく、例えば塩辛の熟成（おもにアミノ酸の生成）が微生物によるのか自己消化酵素によるのかというような最も重要と思われる問題についても、清水<sup>1)</sup>、長尾ら<sup>2)</sup>は微生物の関与は小さいとしているのに対し、森ら<sup>3)</sup>は細菌作用も大であると主張しており、明確な結論が出されていないのが実状である。著者ら<sup>4)</sup>は最近、熟成中の微生物作用と酵素作用を実験的に区別することにより、この点について検討を行った結果、アミノ酸生成には細菌はほとんど関与していないことを明らかにした。しかしその際、微生物作用を抑制した実験区では塩辛特有のにおいがまったく生成しなかったことから、微生物はむしろ塩辛の香気成分生成という点で寄与していることが示唆され、この点の解明が今後の重要な課題として残された。

ところで、塩辛におけるこれら微生物の役割を明らかにしていくためには、そこに存在する微生物の種類（フローラ）を把握しておくことがまず必要である。この点についても従来いくつかの研究があり、それらの結果は、*Staphylococcus*属または*Micrococcus*属に該当する球菌類が優占菌群であるという点ではほぼ一致しているが、それらの出現頻度や菌群の種別については異なっている。たとえば、イカ塩辛中の*Staphylococcus*属について、森ら<sup>3)</sup>は*Staphylococcus* II 亜群を、藤井ら<sup>4)</sup>はその他に未同定群を主に検出し、また高井ら<sup>5)</sup>は*S.warneri*、*S.xylosus*および*Staphylococcus* II 亜群を検出しているというように、その出現種は一定ではなく、また、*Micrococcus*属については種レベルでは同定されていない。

このようにイカ塩辛中の各細菌の出現時期が研究者間において異なっていたり、菌群の種別がかなり幅広いものになる要因として、研究者間でイカ塩辛の塩分濃度や培地の組成・塩分濃度、培養時間などの実験条件が異なったり、分離菌の同定に用いたマニュアルが異なることなどが挙げられる。とくに食塩を10%程度以上含む塩辛では、低塩分培地で分離される細菌よりも10%程度の食塩存在下で増殖できる細菌の方が重要と考えられるが、低塩分培地を用いた場合には、食塩を10%程度以上含む塩辛中で増殖する耐塩性および好塩性の細菌フローラを正しく反映していない可能性がある。事実、上記の検討の際に好塩細菌用の培地を併用したところ、

*Micrococcus*と推察される菌群が*Staphylococcus*とはほぼ同程度の菌数レベルで検出されることが分かった。そこで本研究では、熟成中のフローラを、塩辛中で重要と考えられる耐塩・好塩性細菌を中心に属および種レベルで検討した。

## 2. 研究方法

### 2-1 イカ塩辛試料

供試イカ塩辛（赤作り）は、下記の時期に青森県で水揚げされたスルメイカを用い、伝統的製造法<sup>6)</sup>に準じて、合計5組調製した。まずイカの外套筋と内臓を手で引き離し、外套筋を水洗後、十分に水切り細切りした。そして、外套筋重量の5%の肝臓内容物を添加混合し、さらに外套筋および添加肝臓内容物との総重量の10%の食塩（国産化学1級）を添加した。これをホーロー製広口瓶に貯蔵し、20℃で熟成を行った。仕込み後は毎日1回十分に攪拌を行った。なお、合計5組の供試イカ塩辛は1993年7月から1994年7月までに調製したもので、以下ではそれぞれ、試料Ⅰ（94年6月製造）、Ⅱ（94年6月製造）、Ⅲ（94年6月製造）、Ⅳ（94年7月製造）およびⅤ（93年6月製造）と称する。

### 2.2 生菌数測定

試料Ⅰ～Ⅳは0, 14, 28, 42日目に、試料Ⅴは0, 7, 14, 21, 28日目にそれぞれ5gずつを無菌的に採取し、2.5%NaCl添加希釈水（NaCl 25g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5g, D.W. 1000ml）または10%NaCl添加希釈水（NaCl 100g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10g, D.W. 900ml）各45mlとともにストマッカーに2分間かけたものを試料原液とし、必要に応じて10倍希釈し、この希釈液をそれぞれ一般細菌用に2.5%NaCl添加BPG培地（glucose 1g, polypeptone 5g, extract bonito(和光) 5g, agar powder 15g, NaCl 25g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5g, KCl 1g, D.W. 1000ml, pH 7.0）および10%NaCl添加BPG培地（glucose 1g, polypeptone 5g, extract bonito(和光) 5g, agar powder 15g, NaCl 100g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10g, KCl 1g, D.W. 900ml, pH 7.0）を用い混釈法で生菌数測定を行った。なお、2.5%NaCl添加BPG平板培地は20℃で7日間培養後、10%NaCl添加BPG平板培地は20℃で14日間培養後、コロニー数からそれぞれの生菌数を算出した。

### 2.3 供試菌株

生菌数測定に用いた2.5%及び10%NaCl添加BPG平板培地より釣菌し、画線・純粋分離を行った後に性状試験に用いた。それぞれの平板培地から純粋分離した菌株数は次の通りである。2.5%NaCl添加BPG平板培地については、試料Ⅰ、Ⅲ、Ⅳより各80株、試料Ⅱより120株、試料Ⅴより150株を、また10%NaCl添加BPG平板培地については、試料Ⅰより65株、試料Ⅱより120株、試料Ⅲ、Ⅳより各80株、試料Ⅴより150株を純粋分離し、合計1005株を本実験に使用した。

## 2.4 分離細菌の属レベルでの同定

分離菌株はグラム染色、形態、胞子形成能、運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、グルコースの分解能、生育食塩濃度、硝酸塩還元、インドール、硫化水素産生能について試験を行い、Okuzumi *et al.*<sup>7)</sup>の図式に従って属レベルでの同定を行った。なお、特記しない限り、試験培地には分離培地と同組成のB P G液体培地に接種後、20℃で24～48時間前培養したものをを用いた。また、試験培養温度は20℃で行った。

## 2.5 *Staphylococcus*および*Micrococcus*属の種レベルでの同定

上記の試料V中で*Staphylococcus*属および*Micrococcus*属に分類された276株については、Baird-Parker<sup>8)</sup>、Bergey's Manual<sup>9)</sup>およびThe Prokaryotes<sup>10)</sup>に従って、種レベルでの同定を行った。なお供試菌株は特記しない限り tryptone-yeast extract medium (tryptone(Difco) 10 g, yeast extract (Difco) 1 g, NaCl 25 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.5 g, KCl 1 g, D.W. 1000ml, pH 7.2) に接種後、37℃で24～72時間培養したものをを用い、試験培養温度も37℃で行った。また、各種性状試験培地の食塩濃度は特記しない限り2.5%(w/v)に設定した。

### 2.5.1 グルコースからの好氣的並びに嫌氣的酸生成試験

Baird-Parkerの方法<sup>7)</sup>に準じ、6.0×0.5インチの試験管を用いた試験培地に前培養液を接種し、酸産生の有無を14日間毎日観察を行った。

### 2.5.2 各種糖類から好氣的酸生成試験

Baird-Parkerの方法<sup>8)</sup>に準じ、D-xylose、L-arabinose、raffinose、sucrose、maltose、D-mannitol、D-mannose、 $\alpha$ -lactose、D-trehaloseの9種類の糖について、好氣的酸生成の有無をheart infusion broth (heart infusion broth (Difco) 25 g, D.W. 1000ml, pH 7.4) で前培養した菌株を試験培地（基礎培地：yeast extract (Difco) 1 g, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 g, bromocresol purple 0.04 g, agar powder 15 g, D.W. 1000ml, pH 7.0をオートクレーブ後、フィルター滅菌した各10%(w/v)糖溶液を添加し、最終的に5%(w/v)の糖濃度にしたもの)に画線し、14日間毎日観察した。

### 2.5.3 アセトイン産生試験

V P半流動培地（栄研）を用い、アセトインの産生試験を行った。

### 2.5.4 ホスファターゼ試験

新細菌培地学講座<sup>11)</sup>（試験培地：heart infusion broth (Difco) 25 g, phenolphthaleindiphosphate tetrasodium salt (東京化成) 1%(w/v) solution 10ml, agar powder 15 g, D.W. 1000ml, pH 7.4) に準じて行った。

### 2.5.5 アルギニン加水分解試験

新細菌培地学講座<sup>11)</sup>（試験培地：yeast extract 5 g, tryptone 5 g, glucose 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g, L-alginate 3 g, D.W. 1000ml, pH 7.0) に準じて行った。

### 2.5.6 コアグララーゼ試験

菌株を7倍希釈ウサギ血漿0.5mlに接種し、37℃の恒温槽中に3時間放置後、血漿の凝固状態を観察した。

#### 2.5.7 ゼラチン液化試験

新細菌培地学講座<sup>11)</sup> (試験培地: peptone 10 g, extract bonito (日本製薬) 10 g, gelatin (Difco) 100 g, D.W.1000ml, pH 7.0) に準じて行った。ただし、培養は20℃で行った。

#### 2.5.8 カゼインの分解試験

新細菌培地学講座<sup>11)</sup> (試験培地: skim milk powder(Difco) 25 g, nutrient agar(栄研) 35 g, D.W. 1000ml, pH 7.0) に準じて行った。ただし、培養は20℃で行った。

#### 2.5.9 生育食塩濃度試験

0、2.5、7.5、10、15%(w/v)NaCl添加B P G平板培地に2.5%NaCl添加B P G液体培地で前培養したものを接種し、20℃で14日間観察を行った。

### 3. 結果および考察

試料 I ~ V における生菌数測定等の結果をTable 1 に示した。2.5%NaCl添加B P G平板培地では0日目では $10^2 \sim 10^3 / g$ であったものが、14日目では $10^6 \sim 10^7 / g$ と急激に菌数の増加が見られ、その後は顕著な変化が見られず、 $10^6 \sim 10^7 / g$ を推移した。また、10%NaCl添加B P G平板培地においては0日目は $10 \sim 10^2 / g$ であったが、14日目以降は $10^6 / g$ 以上に菌数が増加し、2.5%NaCl添加B P G平板培地と同様の傾向を示した。10%NaCl添加B P G平板培地における0日目の生菌数の低い値は、10%という高い食塩濃度によりイカ塩辛の貯蔵初期に2.5%NaCl添加B P G培地中で多く見られたグラム陰性の桿菌が抑制されたためであろうと考えられる。

次に試料 I ~ V より分離した菌株について、Okuzumi *et al.*<sup>7)</sup> の図式に従って属レベルでの同定を行った結果をTable 2および3に示す。2.5%NaCl添加B P G平板培地より分離した各試料中の菌株については、全ての0日目試料から *Acinetobacter*、*Moraxella*、*Corynebacterium*・*Arthrobacter* 属のグラム陰性桿菌と酵母が検出されたが、試料 V については7日目、試料 II、IV、については14日目、試料 I、III については28日目以降に *Staphylococcus* 属、*Micrococcus* 属といったグラム陽性の球菌が優占菌群となった。一方、10%NaCl添加B P G平板培地より分離した各試料中の菌株では、試料 V においては7日目、試料 I、II、IV においては14日目以降、試料 III においては28日目以降に *Staphylococcus* 属と *Micrococcus* 属が優占菌群となった。

このようにいずれのイカ塩辛中においても、熟成が進むにつれて *Micrococcus* 属と *Staphylococcus* 属が優占菌群となっているが、この原因としてはイカ塩辛が10%という比較的高濃度の食塩が存在するため、グラム陰性無芽胞桿菌の生育に不適当な

環境であると同時に、*Staphylococcus*属等の球菌群が比較的強い塩耐性をもつためと考えられる。これまで塩辛のフローラを調べた報告をみると、森ら<sup>3)</sup>は熟成過程において優勢となる菌種は*Staphylococcus* II 亜群に属する同一菌群としているが、藤井ら<sup>4)</sup>によるとそれ以外の*Staphylococcus*属および*Micrococcus*属が優勢となるとしており、さらに高井ら<sup>5)</sup>も*Staphylococcus* II 亜群に該当しない*S. xylosus*などの菌群が優勢となるとしており、かなり異なっている。これらの結果は実験条件などが異なるため一律に比較することはできないが、かなり幅広い菌群にわたる可能性が考えられ、本研究の分離菌株についてもさらに種レベルの同定が必要とされよう。

そこで次に試料Vより分離した菌株のうち、*Staphylococcus*属および*Micrococcus*属に分類されたものについて、種レベルでの同定を行ったところ、Table 4に示したように*Staphylococcus*属は7種に分類され、*Micrococcus*属は2種に分類された。*Staphylococcus*属の中で優占菌種となったものは、*S. warneri*で、次いで*S. haemolyticus*であり、この2種で*Staphylococcus*属の約89%(159/179株)を占めた。経時的な変化(Table 5)を見ると、10%NaCl添加培地において*S. warneri*は貯蔵7日目ですでに優占菌種となり、14日目まで微生物叢中の約80%占め、2.5%NaCl添加培地では貯蔵7日目から21日目まで約30~46%を占めていた。また、*S. haemolyticus*については10%NaCl添加培地では14日目以降は検出されず、2.5%NaCl添加培地では7日目から28日目まで常に検出された（占有率は約20~50%）。一方、*Micrococcus*属では、*M. varians*が同属の約86%(67/78株)を占め、経時的な変化を見ると特に10%NaCl添加培地においては21日目以降に微生物叢中の約70%を占めた。全供試菌株中での分布では*Staphylococcus*属が約60%(179/300株)、*Micrococcus*属が約26%(78/300株)を占有し、両球菌群が約86%(255/300株)を占める結果となった。

このように*Staphylococcus*属および*Micrococcus*属がイカ塩辛中の優占菌群となり、また*S. warneri*を多く検出している点や熟成期間を通して特定の1種が優勢となるのではなく、*Staphylococcus*属内種間で菌叢変遷を示している点については高井ら<sup>5)</sup>の結果と類似しているが、熟成期間を通して*Staphylococcus*属がつねには優勢とならず、熟成中期以降は*Micrococcus*属がかなり優勢となる点については高井らの結果とは異なった。また、熟成後期付近において藤井ら<sup>4)</sup>は*Streptococcus*属を、佐藤ら<sup>12)</sup>は*Pediococcus*属を検出しているが、本研究からはいずれの菌群も検出されなかった。しかし、佐藤らが用いたイカ塩辛の食塩濃度は14%~18%と高濃度であり、また検出された乳酸菌が熟成20日目頃から増殖し始め、60日目に $10^8$ CFU/gに達したとしているが、本研究では塩辛の食塩濃度が10%であり、また乳酸菌の検出時期がかなり遅く、実際のイカ塩辛の可食期間を考慮すると乳酸菌の有益な役割については疑問が残る。

本研究に用いたイカ塩辛試料において、熟成初期から中期（0日目から28日目以

内) においてはすべての試料に共通した微生物叢の変遷パターンは見られなかったが、熟成後期(28日目)以降において、*Staphylococcus*属および*Micrococcus*属が必ず出現しており、これらの細菌がイカ塩辛の熟成後期以降の微生物叢の主要な構成菌群となっているものと考えられる。

また、本研究の結果でも、Table 5のように、培地の食塩濃度により細菌叢の構成種が異なることが明らかになった。熟成14日目において2.5%食塩添加培地では、*S. haemolyticus*が60%(18/30株)、*S. warneri*が30%(9/30株)を占めていたが、10%食塩添加培地では*S. warneri*が80%(24/30株)を占めて優占種となっており、さらに熟成21日目以降では2.5%食塩添加培地では*Staphylococcus*属が約70%、*Micrococcus*属が約30%を占めたが、10%食塩添加培地では*Micrococcus*属が約80~90%を占める結果となっており、特に熟成が進むにつれ、食塩濃度の影響が強く現れると考えられた。

#### 4. 今後の課題

本研究の結果からも、塩辛の細菌叢は分離に用いる培地の食塩濃度により結果が異なることが明らかとなった。これまで行われた細菌叢に関する研究結果が研究者間<sup>2-4)</sup>でかなり異なる要因には、試料自体の問題のほか、このような食塩の影響も大きいと考えられるので、これらの点を考慮して解析を進めていく必要がある。上に主要菌群として特定された*Staphylococcus*および*Micrococcus*の菌種は、10%食塩存在下でも増殖可能な菌群であり、塩辛の熟成中に何らかの役割を果たしていることが期待される。今後は、はじめにも述べたように塩辛の香気成分生成における役割のほか、これら優勢菌群の有用機能についても検討を進めていく予定である。

#### 5. 文 献

- 1) 清水 亘：鯉塩辛の研究(第一報) 庵蔵中に起こる変化. 水産製造会誌, 2, 56-61 (1934).
- 2) 長尾 清, 木村 喬久：塩辛の細菌学的研究(第1報). 水産学雑誌, No.54, 21-24 (1949).
- 3) 森 勝美, 信濃 晴雄, 秋場 稔：いか塩辛熟成過程中的の好気性細菌について. 日水誌, 45, 771-779 (1979).
- 4) 藤井 建夫, 松原 まゆみ, 伊藤 慶明, 奥積 昌世：いか塩辛熟成中のアミノ酸生成における微生物の関与について. 日水誌, 60, 265-270 (1994).
- 5) 高井 典子, 川合 裕史, 猪上 徳雄, 信濃 晴雄：赤作りと黒作りイカ塩辛の微生物学および化学的特性の比較. 日水誌, 58, 2373-2378 (1992).
- 6) 藤井 建夫：“塩辛・くさや・かつお節——水産発酵食品の製法と旨味”, 恒星社



- 厚生閣, 東京, 1992, pp.31-52.
- 7) M. Okuzumi, S. Okuda, and M. Awano : Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 1591-1598 (1981).
  - 8) A. C. Baird-Parker : in "Identification Methods for Microbiologists Part A" (ed. by B. M. Gibbs and F. A. Skinner), Academic Press, New York, 59-64 (1966).
  - 9) R. E. Buchanan *et al.* : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th. ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
  - 10) M. Kocur, W. E. Kloos, and K. H. Schleifer : The Genus *Micrococcus*, in "The Prokaryotes", Vol.2, Springer-Verlag, Berlin, 1300-1311 (1993).
  - 11) 坂崎 利一 : 新細菌培地学講座, 近代出版, 東京, 1978, pp.126-309, pp.388-389.
  - 12) 佐藤 正人, 高重 洋治, 森田 昭博, 信濃 晴雄 : イカ塩辛の熟成過程における乳酸菌について. 日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 224 (1993).

Table 1. Changes in viable bacterial counts, pH, VBN and TMA contents during the fermentation of *shiokara* (sample I~V)

Sample I	Ripening period (days)				
	0	14	28	42	
Bacterial Count A* (cfu/g)	$4.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^7$	
B* (cfu/g)	$3.8 \times 10$	$3.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6$	
pH	5.86	5.91	5.86	6.12	
VBN (mg/100g)	7.10	48.04	57.66	87.40	
Sample II	0	14	28	42	
Bacterial Count A (cfu/g)	$4.6 \times 10^3$	$3.3 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$9.6 \times 10^7$	
B (cfu/g)	$7.6 \times 10^2$	$1.3 \times 10^7$	$8.0 \times 10^7$	$8.0 \times 10^7$	
pH	5.90	6.10	5.96	6.14	
VBN (mg/100g)	8.22	40.93	69.71	87.44	
Sample III	0	14	28	42	
Bacterial Count A (cfu/g)	$1.3 \times 10^3$	$1.7 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	
B (cfu/g)	$3.6 \times 10^2$	$1.7 \times 10^6$	$2.7 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$	
pH	6.04	5.94	6.04	6.05	
VBN (mg/100g)	5.60	56.86	74.08	81.20	
Sample IV	0	14	28	42	
Bacterial Count A (cfu/g)	$5.5 \times 10^3$	$1.4 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	
B (cfu/g)	$7.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$	
pH	5.93	6.01	6.10	6.00	
VBN (mg/100g)	6.99	54.60	4.86	87.92	
Sample V	0	7	14	21	28
Bacterial Count A (cfu/g)	$7.5 \times 10^3$	$9.8 \times 10^4$	$1.7 \times 10^7$	$1.8 \times 10^8$	$9.3 \times 10^7$
B (cfu/g)	$1.4 \times 10^3$	$8.5 \times 10^4$	$5.7 \times 10^6$	$4.7 \times 10^7$	$9.1 \times 10^7$
pH	6.05	6.03	6.05	6.19	6.39
VBN (mg/100g)	6.40	35.24	52.40	80.42	109.18
TMA (mg-N/100g)	0.42	6.32	9.90	11.89	15.72

\*A, 2.5% NaCl-BPG medium; B, 10% NaCl-BPG medium.

Table 2. Changes in microbial flora at genus level during the fermentation of shiokara (sample I~V) on 2.5%NaCl-BPG medium

Genera	R i p e n i n g p e r i o d ( d a y s )															Total						
	Sample I			Sample II			Sample III			Sample IV			Sample V									
	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	7	14		21	28				
<u>Staphylococcus</u>		12	2	11	5	27	30	30	17	1	20	20	9	16	13	6	5	30	21	25	330	
<u>Micrococcus</u>			18	9		3		1					2	4	7	14		1		9	5	73
<u>Corynebacterium-Arthrobaacter</u>	3				3																5	11
<u>Moraxella</u>	4												1								7	12
<u>Acinetobacter</u>	8	8			5			3					5					7			7	36
<u>Pseudomonas I / II</u>	1																	1				2
<u>Pseudomonas III / IV - H</u>										16												16
<u>Enterobacteriaceae</u>	1																					1
<u>Flavobacterium</u>																			1			1
<u>Yeast</u>	2				16			2					3									23
<u>Unidentified</u>	1				1																3	5
<b>Total</b>	20	20	20	20	30	30	30	30	20	20	20	20	20	20	20	20	20	30	30	30	30	510

Table 3. Changes in microbial flora at genus level during the fermentation of shiokara (sample I~V) on 10%NaCl-BPG medium

Genera	R i p e n i n g p e r i o d ( d a y s )																								Total						
	Sample I						Sample II						Sample III						Sample IV							Sample V					
	0	14	28	42	0	14	28	42	0	14	28	42	0	14	28	42	0	14	28	42	0	7	14	21		28					
<u>Staphylococcus</u>	2			5	28	30	30	16				20	20			16	19	7	11	23	30	25	6	2	321						
<u>Micrococcus</u>	1		20	15	1			2									4	1	13	9	7		4	24	129						
<u>Corynebacterium-Arthroacter</u>																															
<u>Moraxella</u>																									10						
<u>Acinetobacter</u>																									14						
<u>Pseudomonas I / II</u>																															
<u>Pseudomonas III / IV - H</u>																									16						
<u>Enterobacteriaceae</u>																															
<u>Yeast</u>	1				1																				3						
<u>Unidentified</u>	1							1																	2						
<b>Total</b>	5	20	20	20	30	30	30	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	30	30	39	30	495						

Table 4. Differential characteristics of isolates from *shiokara* (sample V)

Characteristics	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Shape	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colony pigment	CW	CW	CW	CW	CW	CW	CW	Y	CW
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid from glucose:									
(1) aerobic	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(2) anaerobic	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Acid (aerobically) from									
D-xylose	-	-	-	-	-	-	+	NT	NT
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	+	NT	NT
raffinose	-	-	-	±	-	-	-	NT	NT
sucrose	+	+	+	-	±	-	+	NT	NT
maltose	+	+	+	-	±	-	+	NT	NT
D-mannitol	-	±	±	-	-	±	+	NT	NT
D-mannose	±	-	-	±	-	±	+	NT	NT
α-lactose	±	±	±	-	-	-	±	NT	NT
D-trehalose	-	+	+	-	+	+	+	NT	NT
Acetoin production	+	+	±	±	±	±	±	±	-
Alkaline phosphatase	+	-	-	±	-	-	±	-	-
Arginine dihydrolase	+	±	+	+	±	-	-	-	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	±	-	±	+	-
Coagulase(rabbit plasma)	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
Gelatin hydrolysis	+	+	+	NT	NT	NT	+	+	+
Hydrolysis of casein	-	-	-	NT	NT	NT	-	-	-
Growth on NaCl agar									
0 % (w/v)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5% (w/v)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5% (w/v)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% (w/v)	+	+	+	+	+	+	+	±	±
15% (w/v)	-	±	±	±	±	±	±	-	-
Sub-group	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX

Symbols: CW, cream-white; Y, yellow; NT, not tested; ND, not determined.

I, *S. epidermidis*; II, *S. warneri*; III, *S. haemolyticus*; IV, *S. saccharolyticus*;  
 V, *S. auricularis*; VI, *S. colnii* subsp. I; VII, *S. xylosum*, VIII, *M. varians*;  
 IX, *M. sedentarius*.

Table 5. Changes in microbial flora at species level during the fermentation of *shiokara* (sample V)

Species	Ripening period (day)														Total	
	2. 5%NaCl-BPG							1.0%NaCl-BPG								
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28						
<u>Staphylococcus epidermidis</u>			1	1	2											4
<u>Staphylococcus warneri</u>		14	9	11	5							23	24	6	2	97
<u>Staphylococcus haemolyticus</u>		16	18	6	8							2				62
<u>Staphylococcus saccharolyticus</u>	1											4				12
<u>Staphylococcus auricularis</u>												1				1
<u>Staphylococcus cohnii subsp. 1</u>	3															3
<u>Staphylococcus xylosus</u>	1		2	3	10							1	2			19
<u>Micrococcus varians</u>				8	2								3	22	25	67
<u>Micrococcus sedentarius</u>	1			1	3								1	2	3	11
Total	6	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	276/300

## Changes in Halophilic and Halotolerant Microbial Flora during Fermentation of Squid *Shiokara*

Tateo Fujii and Bon Kimura

Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries

Squid *shiokara* is the most popular fermented seafood in Japan. Several studies have been carried out on the microbial roles during the ripening of *shiokara*. Previously we have studied on the microbial contribution on the ripening processes and concluded that microorganisms which appeared in *shiokara* played little role for the formation of free amino acids, while they were suggested to contribute to the formation of *shiokara* flavor.

In the present study, we attempted to investigate the common features of microbial flora in respect to halophilic and halotolerant microorganisms during the ripening of *shiokara*. Total 1,005 strains of bacteria were isolated from five lots of squid *shiokara* (10% NaCl), using both 2.5% and 10% NaCl medium, and were classified at genus/species level. While *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas* etc. were dominant in the bacterial flora of the initial stage, *Staphylococcus* and *Micrococcus* became dominant in the later stages in three among five *shiokara* samples. Members of the genus *Staphylococcus* and *Micrococcus* occupied 60 and 26% of the total isolates, respectively. About 90% of these *Staphylococcus* were identified to either *S. warneri* or *S. haemolyticus*, while 86% of *Micrococcus* strains identified to *M. varians*. Studies on desirable roles during the *shiokara* fermentation of these dominant bacteria are now in progress.