

助成番号 9955

## 石川県産の伝統的な水産塩蔵製品中の好塩性微生物

助成研究者：久田 孝(石川県農業短期大学 食品科学科)

石川県産の伝統的な塩蔵をともなう水産漬物製品、特に糠漬け製品(塩分10~15%)について、数種の培地を用いて簡易的に微生物フローラを検索した。12の製造元で製造されている糠漬け34製品について調べたところ、全体的な最優勢菌群は好塩性の乳酸球菌 *Tetragenococcus* であった。しかし、その菌数は製造元あるいは製品によって大きく異なり、検出以下( $<10^2/g$ )~ $10^7/g$ であった。好塩性あるいは耐浸透圧性の酵母菌数も製造元あるいは製品によって異なり、検出以下~ $10^6/g$ であった。これらの酵母はグルコースからの乳酸の生成が認められた。これら糠漬け試料のうち3製品のみで、好気性球菌や酵母が乳酸球菌よりも優勢となっていた。糠漬け中の主な有機酸は乳酸であったが、その濃度も0.1~1.7g/100gと製造元や製品によって異なった。揮発性塩基窒素(VBN)は糠漬け中に50~230mg/100gであった。塩分5%前後の減塩糠漬け2製品についても同様に調べた結果、VBN および乳酸の量はかなり低く、それぞれ、30mg/100gおよび0.2mg/100gであった。



助成番号 9955

## 石川県産の伝統的な水産塩蔵製品中の好塩性微生物

助成研究者：久田 孝 (石川県農業短期大学 食品科学科)

## 1. 研究目的

他の日本海地域と同様に石川県でも様々な魚介類の漬物(発酵食品)、特に塩蔵をとまなう糠漬けなどが現在でも伝承されている<sup>1)</sup>。麴漬けやなれずしも含めこれら水産漬物製品中では多くの微生物が活動を行っており、中でも乳酸発酵が風味や保存性等に関与することが示唆されている<sup>2)</sup>。乳酸発酵食品は乳酸菌そのもの、また代謝産物が健康に対して有用性を持つことが知られている<sup>3)</sup>。水産塩蔵製品についても乳酸発酵食品としての研究が精力的に行われている<sup>1,2)</sup>が、これまでの研究では1つ、ないし2、3ヶ所の蔵、あるいは製造元の製品について検討された場合が多く、これまでの報告結果が、市販されている多くの製品でも合致するか否かは明らかではなく、検討を要すると考えられる。本研究では、塩蔵をとまなう水産漬物製品、主に糠漬け製品について、12ヶ所の製造元の、数種の製品について、好塩性微生物の菌数およびその代謝産物等の特徴を検討した。

## 2. 研究方法

### 2-1 実験材料

一般的(伝統的)な魚介類の糠漬けの製法をFig. 1<sup>1)</sup>に示す。製造元によって漬け込みの期間、温度、塩、調味料の添加量などは多少異なる。本研究では石川県内の12の製造元から市販されている糠漬け製品、1~7種類の魚種、計34製品を購入した。それぞれの背肉部分あるいは卵巣部分を試料とし、以下の実験に供した。

その他、塩漬け3製品、塩辛1製品、麴漬け1製品についても同様に検討した。

### 2-2 微生物フローラの検索

0.1%の寒天を含む生理食塩水を用いて常法どおりに希釈した試料0.1mLを、GAM寒天培地(ニッスイ)、ポテトデキストロス寒天培地(ニッスイ)および、それぞれ15%NaClを加えた計4種類の寒天培地に塗抹した。GAM寒天培地については好気培養およびスチールウール法<sup>4)</sup>を用いた嫌気培養を行い、ポテトデキストロス寒天培地の場合、好気培養のみでそれぞれ30℃で7~10日間培養した。出現したコロニーについて、コロニーの色調および形態ごとにコロニー形成数(cfu)を計数した後、細胞形態、グラム染色性、カタラーゼの有無、好氣的発育の観察などを行い、乳酸菌、好気性桿菌、好気性球菌、酵母などのレベルで簡易的に分類した<sup>5)</sup>。また本研究においては、15%NaClを加えた寒天培地に発育可能な菌を好塩性菌とした。

### 2-3 化学成分の分析

水分は試料を細断した後、水分計(Sartorius MA30)を用いて測定した。pHは4倍量の脱イオン水に混釈した後、pHメーター(Horiba F-12)で測定した。塩分濃度は脱イオン水で10~20

倍に希釈後、塩分計(ATAGO ES-421)でNaCl相当量(%)として測定した。グルコースは5~20倍量の脱イオン水で抽出後、グルコースオキシダーゼ法で測定した。揮発性塩基窒素(VBN)は試料から4倍量の10%トリクロ酢酸で抽出後、コンウェイの微量拡散法<sup>6)</sup>を用いて測定した。乳酸および酢酸量は9倍量の脱イオン水で抽出後、脂肪酸分析キット(S-FA-R-01、YMC)を用いたHPLCで分析した(カラム、YMC-Pack FA; 移動相、CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O=30:16:54; カラム温度、50°C; 流速、1.2mL/min; 検出、400nm)。

## 2-4 好塩性乳酸菌および好塩性酵母の性状試験

本研究において優勢菌群として分離された好塩性乳酸菌12株についてグラム染色性、細胞形態、NaCl無添加培地での発育、糖の資化性などを調べた。さらにNaCl無添加培地で明瞭に発育の認められる、あるいは認められない菌株を1株ずつ選択し、それぞれの至適塩分濃度を調べた。ここで塩分としてNaClの他、KCl、MgCl<sub>2</sub>、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>についても検討した。糖の資化性試験には1/2濃度のGAM糖分解用半流動培地(ニッスイ)から寒天を除いた培地(GAM1/2)に、10%NaClを加えたものを基礎培地とし、各糖類0.5%加えた培地を用いた。至適塩分濃度の試験にはGAM1/2培地に0.5%グルコースを加えた培地を基礎培地として用いた。それぞれの菌株をNaCl10%加えたGAM1/2で30°C、4日間前培養し、その培養液0.02mLずつを4mLの試験培地に接種し、30°Cで3~4日間静置培養後、培養液の655nmにおける吸光度およびpHを測定した。

また、好塩性(耐浸透圧性)の酵母として分離した9菌株について糖の資化性、耐塩性および耐糖(グルコース)性について検討した。糖の資化性試験にはPYブロス(酵母エキス3g、ペプトン5g、H<sub>2</sub>O1000mL、pH6.0)にNaCl10%および各糖類2%を加えた培地を用いた。耐塩性の試験にはPYブロスに0.5%のグルコースを加えた培地を用いた。それぞれの菌株をPYブロス(NaCl10%、グルコース0.5%)で30°C、2日間前培養し、その培養液0.025mLずつを5mLの試験培地に接種し、30°Cで2日間振盪培養後、培養液の655nmにおける吸光度およびpHを測定した。

## 3. 結果

### 3-1. 市販水産糖漬け製品の微生物フローラ

Fig. 2に水産糖漬け製品中の微生物フローラを調べた結果を示した。全体的にみて、最優勢菌群は好塩性乳酸菌で、次いで酵母、好塩性球菌が多く検出された。しかし各製品中の好塩性乳酸菌数は製造元によって大きく異なり、高いもので10<sup>7</sup>cfu/g以上検出されたが、製造元(Factory)Gのように低い値あるいは検出されない(<10<sup>2</sup>cfu/g)製品もあった。また、同一製造元でも各製品(魚種)によってフローラにかなりの違いが見られる場合があり、製造元EおよびIでは好塩性乳酸菌が10<sup>6</sup>cfu/g以上検出される製品と、検出以下の製品が存在した。

好塩性(耐浸透圧性)酵母菌数も、検出以下~10<sup>6</sup>cfu/gと各製造元で異なり、また同一製造元であるのに各製品によって菌数に違いが見られたものもあった。製造元Bのタラ、CのエイおよびDのカワハギなどでは好塩性酵母菌数が好塩性乳酸菌数より高く10<sup>5</sup>cfu/g以上であった。

好気性球菌数も、製造元あるいは製品ごとによって異なり、検出以下~10<sup>6</sup>cfu/gであった。好塩

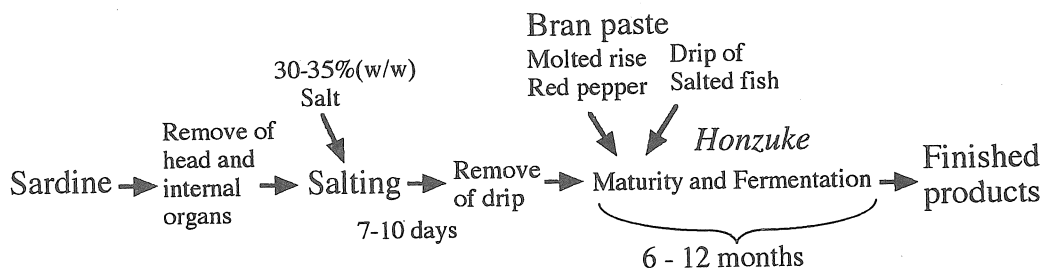


Fig. 1 Process of iwashi nukazuke, a fermented sardine in bran paste.

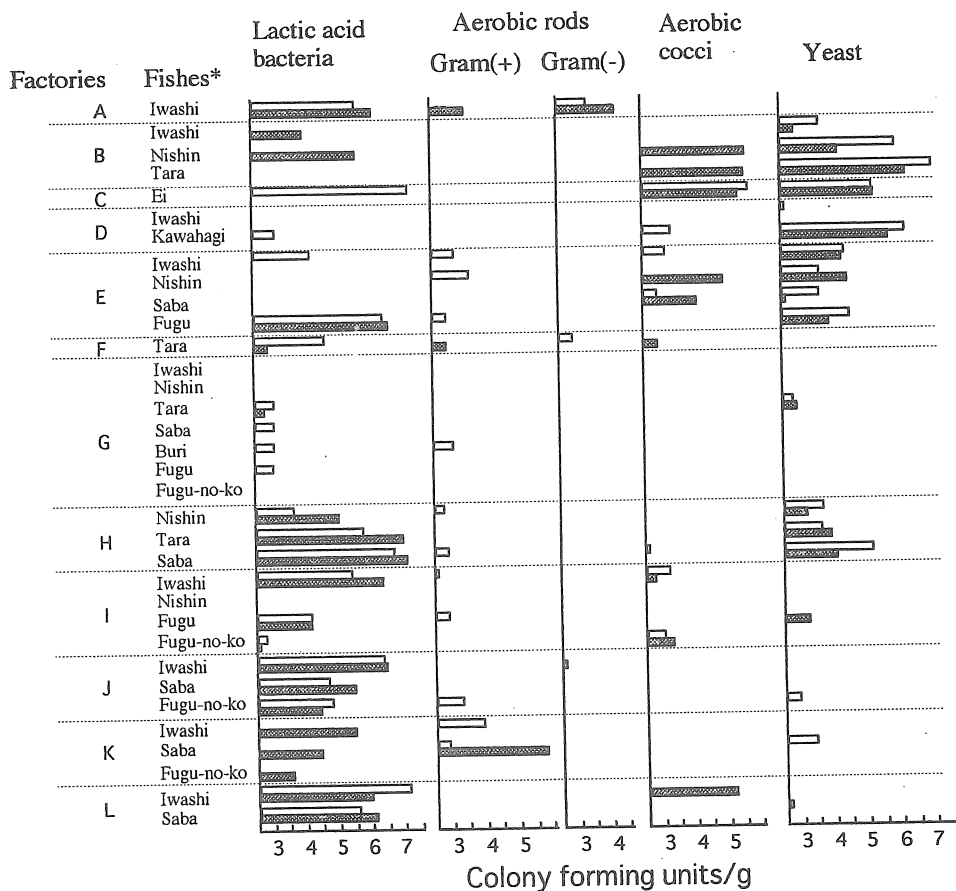


Fig. 2 Microflora in nukazuke

□; colony forming units(cfu)/g on GAM agar or PD agar, ■; cfu/g on GAM agar added 15% NaCl or PD agar added 15% NaCl.

\* Iwashi; sardine, nishin; Pacific herring, tara; Pacific cod, ei; stingray, kawahagi; trigger fish, saba; mackerel, fugu; puffer, buri; yellow tail, fugu-no-ko; puffer ovary.

性のグラム陽性桿菌は  $10^5$  cfu/g 検出された製品がひとつあり、その他は  $10^3$  cfu/g 以下であった。

### 3-2. 市販水産糠漬け製品の化学成分

糠漬け製品中の化学成分を Fig. 3 に示した。水分はほとんどの糠漬け製品で 40~50%、塩分は 10~15%、pH 5.0~6.0 であった。VBN 値はほとんどの製品で 50~100mg/100g であったが、製造元 E および L のイワシでそれぞれ 230mg および 190 mg /100g と高い値を示した。各製品中の主な有機酸は乳酸であり、好塩性乳酸菌数が  $10^6$  cfu/g 以上の製品で乳酸濃度が高い傾向があったが、乳酸菌が検出されないにも関わらず乳酸濃度の高い (1g/100g 以上) ものが同一製造元 (E) で 2 製品存在した。酢酸の含量はほとんどの試料で 0.1g/100g 以下であった。グルコース量は各試料中に 0.5~5 g/100g であった。

### 3-3. 市販水産漬物（糠漬け以外）製品の微生物フローラ

減塩糠漬け（塩分 5% 前後）でも上記の糠漬け製品で優勢菌であった好塩性乳酸菌、および酵母が  $10^4$ ~ $10^5$  cfu/g 検出された (Fig. 4)。製造元 C の塩漬け製品から好塩性微生物は検出されなかったが、塩イカ（スルメイカを姿のまま塩漬けした製品）からは好塩性の好気性球菌が優勢菌として検出された。イカ塩辛からは好塩性の乳酸菌および好気性球菌が  $10^4$  cfu/g ほど検出され、好気性球菌のほうが優勢であった。

麹漬け製品のいわしずし（酢漬けしたイワシの腹の部分に、おからと麹をつめて漬けたもの）の場合、おからの部分で菌数が多く、乳酸菌および好気性球菌が優勢で  $10^6$  cfu/g 程度で、その他酵母および好塩性乳酸菌が検出された。

### 3-4. 市販水産漬物（糠漬け以外）製品の化学成分

減塩糠漬けの各成分を上記の糠漬けと比較すると、pH は高めの値で、VBN および有機酸量は顕著に低く、グルコース含量が高かった (Fig. 5)。塩サバの塩分濃度は 10% 程度で乳酸も 5mg/g 程度認められたが同一製造元の塩サバノコ（卵巣）は塩分濃度 28%、乳酸量は 1mg/g 程度であった。塩イカの場合、塩分濃度は 22%、VBN は 90 mg /100g 程度認められたが、今回実験に供したイカ塩辛の場合、塩分濃度は 7%、VBN は 10 mg /100g 程度しか認められなかった。いわしずしの塩分濃度は 2.5% 程度で、pH は 4.5 前後であった。VBN は 10 mg /100g 以下で、酢酸が 7~9mg/g、乳酸が 3mg/g 前後認められた。これら塩漬、塩辛製品中のグルコースは 1mg/g 以下で、ほとんど検出されなかった。

### 3-5. 糠漬け由来好塩性乳酸菌の性状

Table 1 に示すように今回水産糠漬け製品から優勢菌として分離した好塩性乳酸菌 12 株は全て球菌で、そのほとんどが 4 連球菌として観察され、好氣的発育が弱いことから *Tetragenococcus* 属と推定される。12 株中 7 株は NaCl 無添加の培地でもよく発育したが、その他の 5 株の発育は 30°C、3 日間の培養ではほとんど認められなかった。糖の資化性試験ではリボース、スクロース、ラクトース、ソルビトールの資化性は菌株によって異なった。この実験で最も多くの糖の資化性を示し、食塩無添加培地でも発育を示した K1 株および、資化性を示した糖類が最も少なく、食塩無添加培地では発育がほとんど認められなかった K5 株について、至適塩分濃度を調べた結果 (Fig. 6)

Factories Fishes\*

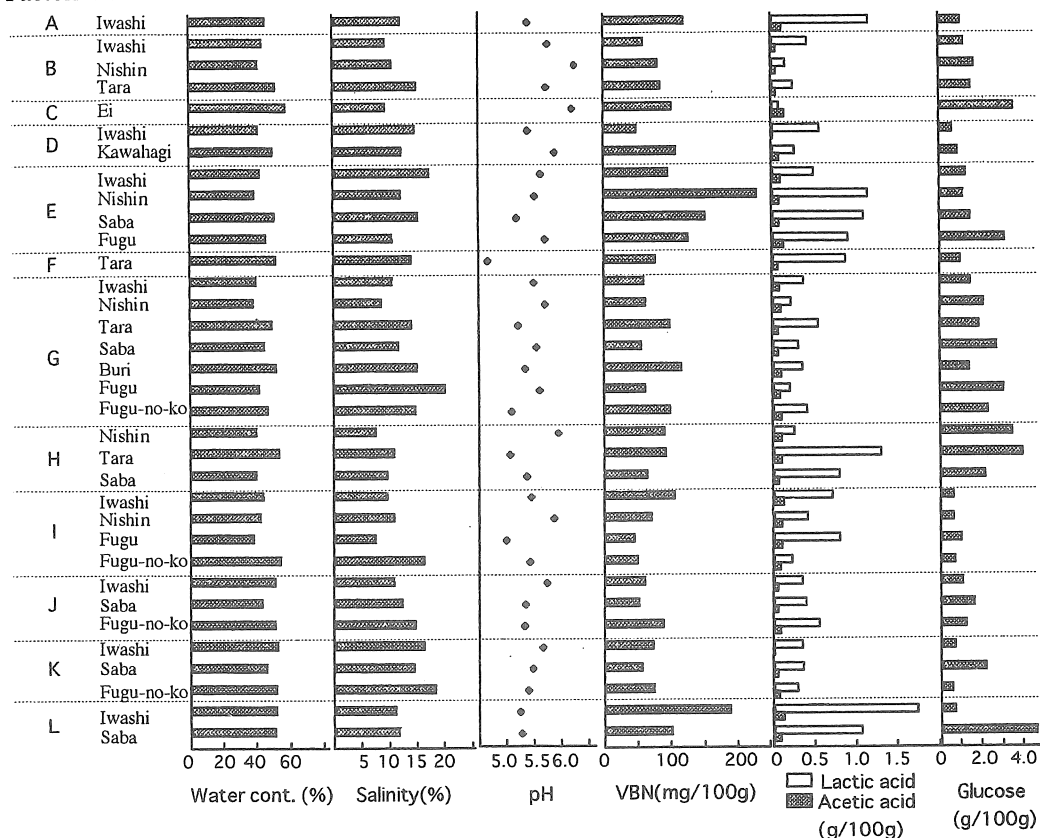


Fig. 3 Chemical compounds in nukazuke

See footnotes of Fig. 2.

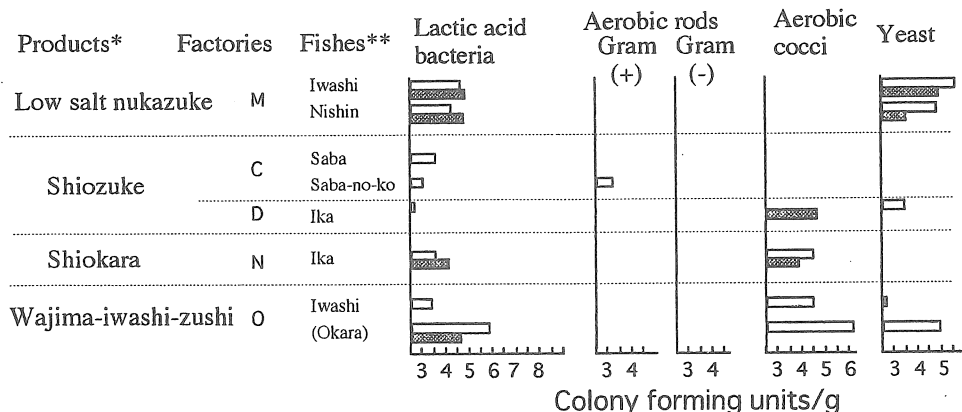


Fig. 4 Microflora in low salt nukazuke, shiozuke, shiokara and Wajima-iwashi-zushi

See footnotes of Fig. 2.

\* Shiozuke; salted fishes. shiokara; ripened mixture of shredded meat, liver contents and NaCl, Wajima-iwashi-zushi; sardine pickled and fermented with bean-card refuse(okara) and molted rice.  
 \*\* Saba-no-ko; mackerel ovary, ika; squid.

NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub> および Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の至適濃度はそれぞれ 2.0mol/L、1.0mol/L、0.75mol/L および 0.7mol/L 前後で、NaCl 以外の塩分に対しても好塩性を示したが、それぞれの至適塩分濃度での K1 株の発育は NaCl によって最も支持された。

### 3-6. 糠漬け由来好塩性（耐浸透圧性）酵母の性状

糠漬けから分離された好塩性酵母について糖の資化性試験を行った結果、今回検討した性状試験の範囲では全ての分離株同様の結果を示し、グルコース、マンノースおよびフラクトースの資化性を示し、ガラクトース、アラビノース、スクロース、マルトース、ラクトース、ラフィノースの資化性は認められなかった。これらの菌株について耐塩性および耐グルコース性を調べた結果 (Fig. 7)、各塩分とも 2N 相当の濃度まで、さらにグルコースの場合 3mol/L でも十分な発育が認められた。

## 4. 考察

上述したように、水産糠漬けの発酵に関しては既にいくつかの報告があり<sup>1, 2)</sup>、その発酵過程で好塩性乳酸球菌 *Tetragenococcus* が 10<sup>6</sup>/g 程度、酵母が 10<sup>3</sup>/g 程度まで増加するとされている。今回市販製品を調べた結果でも、全体の優勢菌として *Tetragenococcus* が検出されたが、その菌数は製造元あるいは製品間で大きく異なっており、Fig. 2 に示した製造元 G のようにほとんどの製品において検出されない場合もあった。*Tetragenococcus* は醤油や味噌の発酵でも重要な細菌であることが知られており<sup>7)</sup>、水産糠漬けでも、この好塩性乳酸菌の有無が製品間の風味の違いに表れるものと考えられる。*Tetragenococcus* は *T. halophilus* の 1 種のみが知られてきたが、最近、飛島のイシルから分離されたヒスタミンを生成する好塩性乳酸球菌が、16S rRNA 塩基配列の違いから新種 *T. muriaticus* として報告されている<sup>8)</sup>。Fig. 7 に示された K1 や K5 株の至適塩分濃度を Bergey's Manual<sup>9)</sup> 記載の *T. halophilus* の至適塩分濃度 (6~8%) と比較すると、より高濃度側にあり、糠漬製品の塩分濃度の範囲と一致していた。同じ好塩性の *Tetragenococcus* でも生息環境に順応して性状が異なってくるものと考えられる。

糠漬けから分離した耐塩性あるいは耐浸透圧性を示した酵母は、グルコースを代謝して産生する主な有機酸が乳酸であることを HPLC で確認している (データは示さず)。これらの酵母の至適塩分濃度は K1 および K5 株より低濃度側にあるものの、好塩性乳酸菌が少ない製品の場合には乳酸の生成を担う可能性が考えられる。各糠漬け試料には 0.5~5% 程度と有機酸生成に十分のグルコース量が認められた。

Fig. 4 および 5 に示した製造元 M の糠漬け製品は塩分濃度が 5% 前後で、塩分による腐敗細菌の抑制<sup>10)</sup> は不可能であると考えられるが、VBN や有機酸量は他の糠漬けと比べかなり低い値であった。この製品については糠の風味を利用するために浅漬け、あるいは和えた状態で、いわゆる糠漬けの発酵過程は起こっておらず、流通には低温、保存料などが必要であると思われる。同様に製造元 D の塩漬イカと N のイカ塩辛を比較した場合にも、塩分濃度の高い塩漬イカの方で VBN 量が高かった。どちらの製品からも、これまでの報告<sup>11)</sup> と同様に、好塩性の好気性球菌が検出されているが、塩分濃度の低いイカ塩辛では腐敗防止のため、低温および保存料の添加によ



Products Factories Fishes

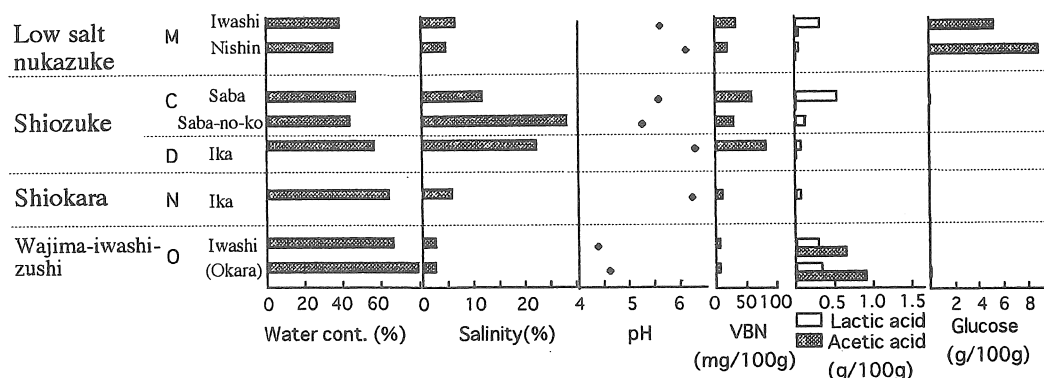


Fig. 5 Chemical compounds in low salt nukazuke, shiozuke, shiokara and Wajima-iwashi-zushi  
See footnotes of Fig. 2, 3 and 4.

Table 1 Characteristics of halophilic lactococci isolated from nukazuke

<i>Tetragenococcus halophilus</i> <sup>1</sup>		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cell shape	c	c	c	c	c	c	c	c	c
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth under O <sub>2</sub>	w	w	w	w	w	w	w	w	w
Growth at 40°C	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Growth at pH 4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 8.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth with NaCl 0%	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Optimal NaCl (%)	6-8				10-14			10-14	
Growth with NaCl 15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of sugars									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Raffinose	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
No. of isolates		3	2	2	1	1	1	1	1
		B2	J1	J2	K1	K2	K4	K5	M1
		C2	K3	J3					
		C3							

+; positive, -; negative, w; weak, c; cocci.

<sup>1</sup> Data from reference 9.

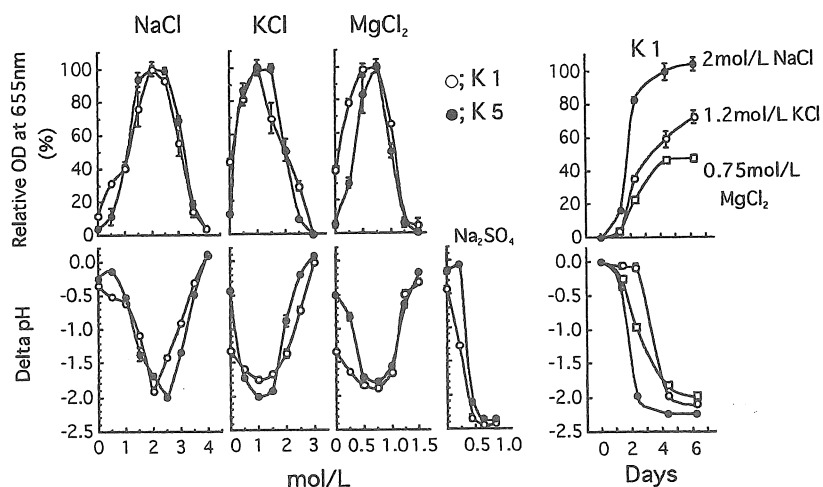


Fig. 6 Effect of salinity on growth of lactococci strains K1 and K5 isolated from nukazuke.

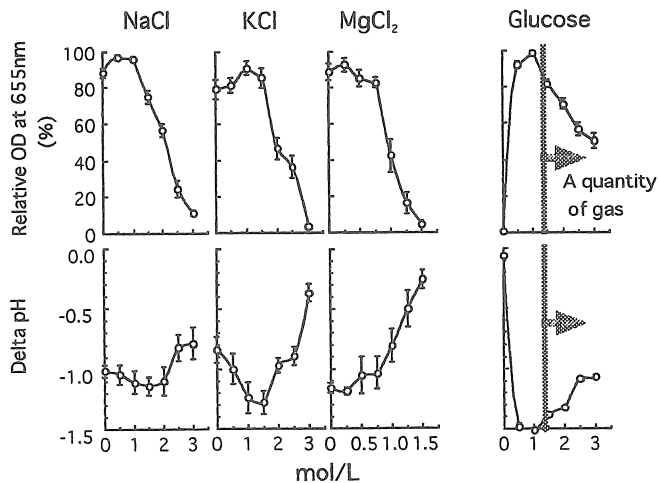


Fig. 7 Effect of salinity and glucose content on growth of halophilic or osmophilic yeasts isolated from nukazuke.

Values are mean and SE of nine strains.

て微生物の活動が抑えられていると考えられる。

同じ石川県の伝統的な麴漬け製品である、塩漬したカブとブリを漬けた“かぶらずし”の場合でも、製造元によって乳酸菌数や乳酸量に大きく異なることが報告されている<sup>5)</sup>。これら伝統的な水産漬物、水産発酵食品でも、家庭内で民間的に製造されていたときは違い、食品工場で作られている。均一な製品を作るために、微生物による働きを利用するよりも熟成中は低温(0℃)下で微生物の働きを抑え、出荷する直前に調味料や保存料で仕上げる場合もある。また、消費者側の減塩

志向やソフト、フレッシュ感覚を好む傾向のため、本来の風味とは異なる製品が今後増加することも考えられる。我々は、これら志向に合わせた商品の開発も重要であるが、本来の伝統的な技法の保存と、その化学的、微生物学的な検討も重要であると考えている。

## 5. 今後の課題

以上のように市販の塩蔵をとまなう水産漬物製品の微生物フローラおよびその代謝物は、製造元、あるいは製品間によって大きく異なった。これらの結果は、品質と関連するものと考えられるが、本研究においては官能検査、保存性など、品質に関する実験を行っておらず、今後検討する必要がある。また、分離される微生物についても遺伝子レベルで比較するとともに、乳酸以外の生成物、例えば bacteriocin などの生理活性物質などについても検討したい。

## 6. 文献

1. 藤井建夫. 加賀に息づく魚の漬物（横山理雄、藤井建夫編. 伝統食品・食文化 in 金沢）. 幸書房、東京、1996、1-11.
2. 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、71-98.
3. 森地敏樹、小崎道雄. 乳酸菌とヒトのかかわり（小崎道雄編. 乳酸発酵の文化譜）. 中央法規、東京、1996、307-322.
4. 光岡知足. 腸内菌の検索法（日本細菌学会教育委員会編. 嫌気性菌の分離と同定法）. 菜根出版、東京、1988、75-85.
5. 久田 孝、庄田麻美、森村奈々、横山理雄. 金沢産かぶらずしおよびだいこんずしの微生物フローラ. 日水誌、1998;64:1053-1059.
6. Conway EJ. *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. Crosby, Lockwood and Son, London. 1950. 87-107.
7. 好井久雄. 味噌の微生物（微生物の分離法）. R&D プランニング、東京、1986、286-292.
8. Satomi M, Kimura B, Mizoi M, Sato T, Fujii T. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver source. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47: 832-836.
9. Garvie EI. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68<sup>AL</sup>, In: (Sneath PHA, Mair NS, Sharp ME, Holt JG eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2*. Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986. 1075-1079.
10. 藤井建夫. 微生物制御の基礎知識—食品衛生のための90のポイント. 中央法規、東京、1997、79-84.
11. Cheng Y, Kimura B, Fujii T. Comparison of three culture methods for the differentiation of *Micrococcus* and *Staphylococcus* in fermented squid shiokara. *Fisheries Sci.* 2000; 66: 142-146.

## **Halophilic Microorganisms in Traditional Salted Food of Marine Products Made in Ishikawa Prefecture, Japan**

Takashi KUDA

Department of Food Science, Ishikawa Agricultural College

### Summary

Microflora of traditional salted food of marine products in Ishikawa, Japan were surveyed by a simple method using several media. In the case of 34 products of fermented fishes in bran paste (nukazuke, salinity; 10-15%) made by 12 factories, predominant bacterial groups were halophilic lactococci (*Tetragenococcus*), however samples obtained from the different factories or different fishes showed different numbers of the bacteria ( $<10^2$  to  $10^7$ cfu/g). The numbers of halophilic or osmophilic yeasts, that could produce lactic acid from glucose, were ranged from  $<10^2$  to  $10^6$ cfu/g. In three samples among the nukazuke samples, aerobic cocci and yeasts were dominant rather than the lactococci. Though main organic acid in the products was lactic acid, the lactic acid concentration was also differed (0.1 to 1.7g/100g) by different factories and fishes. Volatile basic nitrogen (VBN) in the nukazuke was ranged from 50 to 230 mg/100g. VBN and lactic acid concentrations in the low salt nukazuke (salinity; about 5%) were very low (about 30 mg/100g and 0.2 g/100g, respectively).