

塩蔵水産発酵食品の品質安定化・安全性向上のための微生物解析・育種

小柳 喬

石川県立大学生物資源環境学部

概要 塩を用いて食品を保存する塩蔵食品の原点は、「適切な塩分濃度で微生物による汚染と腐敗を抑制」しつつ、「食品の嗜好性を維持あるいは向上」させながら「長期間の食品保蔵を可能」にすることである。しかし、昨今の減塩化の波が押し寄せるのにもなって漬物製品が病原性大腸菌に汚染されるなどのケースも発生し、今もう一度、食品製造・貯蔵における塩の役割を見つめ直し、その真の価値を客観的かつ科学的に検証する必要があると考えた。

そこで本研究では、通常 20% に迫る、あるいは上回る塩分を含有する塩蔵水産発酵食品である魚醤油に着目し、塩の濃度と微生物叢の相関がどのようなダイナミズムを描くか、衛生的に望ましい食品を得るためにはどのような塩蔵条件が必要か、その確定を目指して実験を行った。0~30(w/v)% の様々な塩分濃度に設定した魚醤油(イカ内臓を原料とする)を仕込み、熟成初期~後期(9~120 日)にわたってサンプリングを行い、単離培養法による菌種把握および Illumina MiSeq を用いた 16S rDNA 塩基配列解析による細菌叢解析を実施した。その結果、塩分濃度 5% 以下では熟成初期において腸内細菌科のグラム陰性細菌(*Proteus* sp.)や腸球菌類(*Enterococcus* sp.)が分離され、低塩分濃度環境下でイカ内臓が含有する細菌群が生育し熟成が腐敗的に進行したことが示唆された。塩分濃度 10% では同一条件の2つの試験区間で生菌数に大きな差異がみられ、対して 15% 濃度では試験区間に共通して強く制菌効果が表れたことから、10~15% 付近の塩分濃度が魚醤油において安定的に微生物制御を行うための分水嶺となることが示唆された。

また、15%以上の高塩分濃度では殆どの生菌が抑制されながらも、塩蔵食品からの分離が数多く報告されている *Tetragenococcus* 属乳酸菌や、耐塩性を持つブドウ球菌群である *Staphylococcus* 属細菌が残存していた。MiSeq による菌叢解析でもおおむね単離培養法による菌種同定結果を支持する結果が得られたが、5%塩分濃度で特徴的に *Mycoplasma* のリードが検出されるなどの予想しなかった知見も明らかになった。塩分非含有のサンプルにおいても熟成中期以降は *Staphylococcus* 属細菌の占有率向上がみられ、本属細菌がイカ内臓をベースとする魚醤油において塩分濃度に関わらず優勢化しやすいことが示唆された。

総じて、塩分濃度 15%以上において本来塩蔵のもつ制菌効果が強く表れることが本研究データから明らかであり、魚醤油製造においてこの周辺の塩分濃度を堅持することが必須であると考えられた。

1. 研究目的

塩を用いて食品を保存する塩蔵食品の原点は、「適切な塩分濃度で微生物による汚染と腐敗を抑制」しつつ、「食品の嗜好性を維持あるいは向上」させながら「長期間の食品保蔵を可能」にすることである。しかし、昨今の減塩化の波が押し寄せるのにもなって、加工食品における塩の制菌効果が弱化し、漬物製品が病原性大腸菌に汚染されるなどのケースも目立つようになってきた。今もう一度、

食品製造・貯蔵における塩の役割を見つめ直し、その真の価値を客観的かつ科学的に検証する必要がある。

魚醤や魚の糠漬けなどの塩蔵水産発酵食品は、通常 20%に迫る、あるいは上回る塩分を含有する¹⁾。これにより雑菌の繁殖は抑制されるとともに、自己消化酵素の働きによりアミノ酸の遊離等が促されて旨味が増強され、耐塩性乳酸菌の生育により機能性や呈味性が向上する²⁾。塩蔵水産発酵食品は、東南アジアをはじめとする亜熱帯・熱帯

地域に深く根付いており、温帯に位置する我が国よりも遙かに腐敗が起こりやすいこのような地域で大量に製造・消費されていることは注目すべき事実である^{3,4)}。

しかし、これらの塩蔵水産発酵食品においても、発酵槽内の塩分の濃度不均一により腐敗・病原細菌が一時的に増殖したり、ヒスタミン生産型の耐塩性菌が繁殖して危害がもたらされたりと、衛生上解決すべき問題が多々存在する⁵⁾。特にアジア諸国ではこれらの食品がタンパク質源として大きな位置を占めていることもあり、コールドチェーンの未発達な地域でも発酵熟成を経て腐敗しにくい状態に移行させることのできる本食品群を安定に製造できることが重要である。すなわち、塩蔵水産発酵食品の食品安全性を出来る限り高めて安定供給を保証することは、人口100億人時代を将来迎える際の食糧供給問題に向き合うためにも必要不可欠な課題といえよう。本研究では、塩蔵発酵食品において塩の濃度と微生物叢の相関がどのようなダイナミズムを描くか、衛生的に望ましい食品を得るためにはどのような塩蔵条件が必要か、その確定を目指して実験を遂行することとした。モデル食品として石川県でイカ内臓を原料として伝統的に製造される魚醤油「いしる」^{6,7)}を選定し、ラボスケールで塩分濃度を変化させながら仕込み、詳細に微生物叢の違いを解析した。

2. 研究方法

2.1 魚醤油の仕込みおよび発酵熟成

冷凍したイカ内臓を解凍し、終濃度 0、3、5、10、15、20、および 30 (w/w) %となるよう食塩を添加して混合し、30°Cにて静置した。仕込み後1週間は1日1回滅菌したガラス棒を使用して内容物の混合を行い塩分濃度の均質化を促した。1週間経過後はそのまま30°Cにてサンプリング時(～仕込み後120日)まで静置を続行した。サンプリングの際は、分離したイカ内臓残渣(上層)の下部に滲出するエキス層(魚醤油部分)を採取した。腐敗汚染菌を接種したモデル魚醤油の仕込み時は、各菌体培養液(菌株名については後述)を仕込み開始時に接種し、同様にインキュベートを行った(～仕込み後50日)。

2.2 単離培養法による菌種の解析

継時的に魚醤油サンプルを採取し、各種寒天培地に希釈液を塗布し30°Cにて培養のち生菌数測定を行った。de Man Rogosa Agar Medium(MRS 寒天培地)にて乳酸

菌を、Gifu Anaerobe Agar Medium(GAM 寒天培地)にて一般嫌気性細菌を、Tryptone Soya Agar Medium(TS 寒天培地)にて一般好気性細菌を、0.01 (w/v) %クロラムフェニコール含有 Potato Dextrose Agar Medium(PD 寒天培地)にて真菌類の分離を試みた。各サンプルの希釈には滅菌食塩水(各魚醤油の塩分濃度に対応するもの、ただし10%以上の魚醤油サンプルについてはすべて10%滅菌食塩水)を使用し、培養の際は MRS および GAM についてはアネロパックケンキ(三菱ガス化学社製)を使用し嫌気的環境にて培養を行った。各培地については、塩分含有および非含有培地にて単離を行い、培地の塩分濃度については10%未満の魚醤油サンプルには対応する塩分濃度の培地(3および5%)を、10%以上のサンプルについてはすべて10%食塩含有培地を使用した。

1～3週間の培養の後にコロニー数を計測し、魚醤油のエキス部分1mlあたりの生菌数を測定し、コロニー形状ごとに代表株を選抜して単離画線を行った。これらの菌株について Wizard Genomic DNA Purification kit(Promega 社製)を用いてゲノムDNAの抽出を行い、細菌16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)全長増幅用プライマー 7F(5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3')および1510R(5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')を用いて、ExTaq DNA Polymerase(TakaraBio 社製)による全長増幅に供した。増幅断片は0.8 (w/v) %アガロースゲル電気泳動に供してDNAバンド確認の後、QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN 社製)による精製およびプライマーの除去を行った。DNA塩基配列の解析はABI Prism 3130 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 社製)を用いて複数の16S rDNA中の可変領域をカバーするよう行った。得られた塩基配列はBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)により近縁種の検索に供した。

2.3 Illumina MiSeq を用いた網羅的16S rDNAの塩基配列解析

採取した魚醤油サンプル500 mLをイージーエクストラクトfor DNA(AMR 社製)中のビーズ入りチューブに注入し、5分間2サイクルの激しい攪拌を行い、物理的に細胞破碎を行った後、NucleoSpin Tissue kit(マッハライ・ナーゲル社製)を用いて細胞溶解及びゲノムDNAの抽出および精製を行った。抽出したDNAに対して細菌16S rDNAのV4可変領域を含む約300 bpのPCRによる増幅を行

った。増幅の際は、全バクテリアの 16S rDNA に適合するユニバーサルプライマー515F (5'-AATGATACGGCGA CCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAG CMGCCGCGGTAA-3')、および806R (5'-CAAGCAGA AGACGGCATACGAGATXXXXXXXXXXXXXAGTCA GTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') をプライマーとして使用し、DNA増幅用酵素としてPrimeStar GXL DNA Polymerase (TakaraBio 社製) を用いた。各プライマーの5'末端側にはIllumina社製MiSeq用アダプタ配列を付し、806R塩基配列中には各サンプル識別用の12塩基のバーコードタグ配列(Xで示した)を挿入した。PCRにて増幅の後に、該当するサイズのDNAバンドを2%アガロースゲル電気泳動にて確認し、次いでゲルよりDNAの抽出を行った。抽出の際はWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社製) を使用し、抽出後DNA濃度を測定したのち各サンプルが等濃度となるよう1本に混合した。MiSeqを用いた網羅的16S rDNAシーケンス解析はタカラバイオドラゴンジェノミクスセンターに依頼した。

2. 4 MiSeqにより取得した16S rDNA塩基配列の各種解析

取得したリードはRibosomal Database Project (RDP) Classifierにより近縁種の解析に供し、属レベルにて各taxonが細菌叢に占める割合をパーセンテージで算出した。

3. 研究結果および考察

3. 1 単離培養法による魚醤油中の存在生菌の解析

上述のように魚醤油は自己消化酵素の働きを優先させ、微生物的熟成の寄与はそれほど大きくない発酵熟成食品に分類される。しかし、原料に使用する魚種類は元々殺菌工程がなく付着菌や腸内細菌等が生残するため、熟成初期においては相当数の微生物が存在していると考えられる。そこで、魚醤油仕込み中における生菌の推移を詳細に解析するため、0~30 (w/v) %の各塩分濃度で仕込みを行った魚醤油について、単離培養法による生菌数測定と16S rDNA塩基配列に基づく菌種解析を試みた。実験方法に記載の通り嫌気培養条件下 (MRS および GAM, Fig. 1)、好気培養条件下 (TS および PD, Fig. 2) の計4種

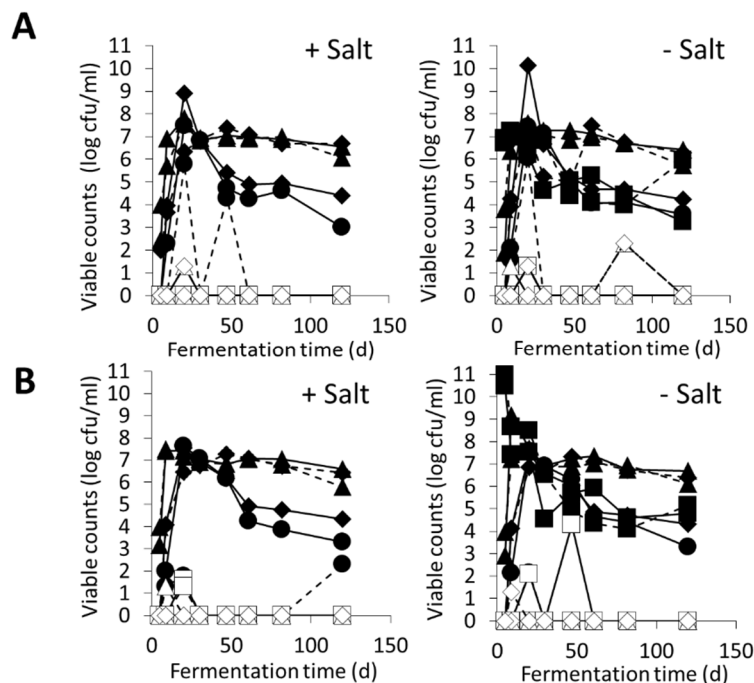


Fig. 1. Viable counts of fish sauce on the MRS (A) and GAM (B) agar plates with (+Salt) or without (-Salt) sodium chloride. Squid organs were incubated with 0 (w/v) % (■), 3 % (▲), 5 % (◆), 10 % (●), 15 % (□), 20 % (△), and 30 % (◇) of salt, and the fish sauce extracts were withdrawn at the indicated time points. Two aliquots of fish sauce were incubated for each salt concentration (continuous and dotted lines)

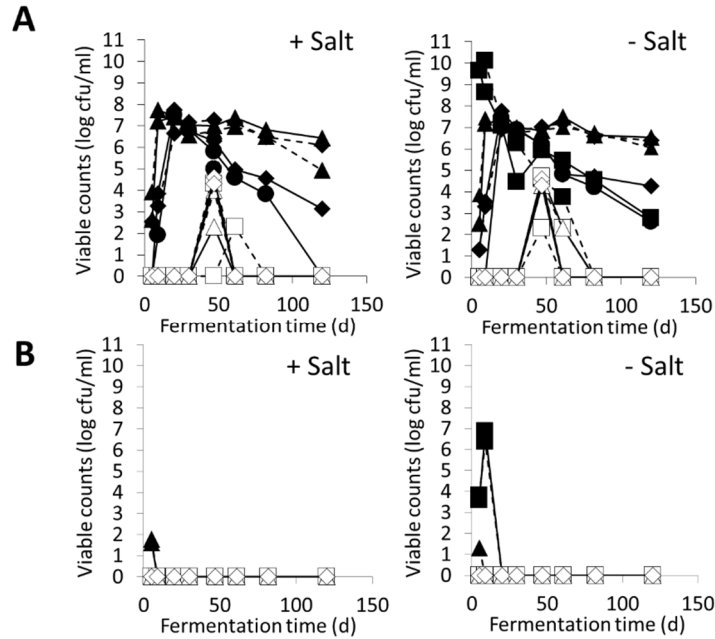


Fig. 2. Viable counts of fish sauce on the TS (A) and PD (B) agar plates with (+Salt) or without (-Salt) sodium chloride. Squid organs were incubated with 0 (w/v) % (■), 3 % (▲), 5 % (◆), 10 % (●), 15 % (□), 20 % (△), and 30 % (◇) of salt, and the fish sauce extracts were withdrawn at the indicated time points. Two aliquots of fish sauce were incubated for each salt concentration (continuous and dotted lines)

の寒天培地を使用し、生菌数を測定した。その結果、嫌気性細菌用 GAM (Fig. 1B)、および好気性細菌用 TS (Fig. 2A)において、塩分を含まない魚醤油サンプル(0%, ■)ではいずれも塩分を含有しない培地 (Salt-)での熟成初期(仕込み後5日目)の菌数は魚醤油エキス1 mlあたり $10^{10} \sim 10^{11}$ cfu/ml と非常に多く、その後 10^9 cfu/ml 以下に速やかに減少するという傾向が見られた。一方、低濃度の塩分(3%)を添加した試験区(▲)では、同日(5日目)の生菌数は塩分含有および非含有培地の双方において $10^2 \sim 10^4$ cfu/ml となっており、低濃度でも塩分添加によって熟成初期の制菌効果が微弱ながら表れていると考えられた。塩分濃度 0~5%の試験区は GAM および TS 培地においていずれも熟成進行中の生菌数は減少傾向もしくはわずかに減少傾向であり、仕込み後 120 日経過後の生菌数は $10^3 \sim 10^7$ cfu/ml と大きなばらつきが見られた。塩分濃度 10%(●)での生菌数推移は極めて不安定であり、同一塩分濃度あたりに設けた2つの試験区(実線および点線)の間で大きな菌数の相違が表れた。5%以下の試験区群とはほぼ同等の推移を示した試験区(実線)と、仕込み後 21 日目および 47 日目に菌数の一過的な上昇(MRS

(Fig. 1A), GAM (Fig. 1B), および TS (Fig. 2A))が見られ、仕込み後 120 日目においても 10^2 cfu/ml 程度のわずかな生菌数上昇(GAM)が見られた他は殆ど生菌が確認されなかった試験区(点線)に分かれた。これは、本塩分濃度(10%)が、イカ内臓をベースとする魚醤油において微生物制御を行う上での分水嶺的濃度となっていることを示唆している。原料ベースでこのような濃度は変化する可能性もあり、イワシやハタハタなどを原料とする我が国他地域での魚醤油、その他多種類の魚種が用いられるアジア地域の魚醤油での当該濃度をさらにケース別に調査する必要がある。

15%以上の塩分濃度をもつ魚醤油(□, 15%; △, 20%; ◇, 30%)では、熟成初期から後期に至るまで生菌数は大きく抑制されており、塩分による制菌作用が効果的に表れていることが示唆された(MRS, GAM, および TS)。熟成中期(20~100 日目)に時に生菌数の一過的な上昇が見られる場合もあり(最大で 10^5 cfu/ml 程度)、耐塩性細菌の生育が伺われた。一方、真菌類(PD, Fig. 2B))は低塩分濃度の試験区(0 および 3%)において熟成初期のわずかな期間に検出された他は期間全体を通してほぼ見られな

かったことから(最大 10^7 cfu/ml, 塩分濃度 0%試験区, 仕込み後 9 日目)、真菌の発酵熟成への寄与については大きくなかったことが示唆された。ただし、醤油や味噌、魚醤油などの塩蔵発酵熟成食品では耐塩性酵母などの真菌類が自然生育する場合も多く、より多くのケーススタディが必要である。

生菌数測定時に分離培養した各微生物から代表株を選抜し、16S rDNA 塩基配列解析による菌種同定を行った結果を Table 1 に示す。塩分を含まない0%試験区の魚醤油からは、熟成初期(9 日目)において腸内細菌科に属するグラム陰性細菌である *Proteus* sp. が多数分離されたことから、塩分非存在下でイカ内臓に含まれる腸内細菌群による腐敗が進行したことが示唆された。塩分濃度 10%以上では本菌種は検出されなくなり、生育が抑制されたことが示唆された。また、同日の 0~3%食塩濃度試験区では *Enterococcus* sp. も分離され、やはりイカ内臓由来と考

えられた。このように、塩分濃度が 5%以下の場合には原料に由来すると考えられる生残菌への制菌効果が不十分であること、それらの菌が腐敗的に働く可能性があることが強く示唆された。特に腸内細菌科のグラム陰性細菌の生育は衛生的にも呈味性的にも望ましくなく、塩分濃度の適正維持の重要性が改めて示唆された。一方、熟成中期(47 日目)となるといずれの試験区でも *Proteus* 属細菌は検出されず、代わって *Staphylococcus* 属および *Tetragenococcus* 属が検出された。これらの細菌はいずれも耐塩性もしくは好塩性の性質を保持していることが知られているが、0%塩分濃度試験区でも *Staphylococcus* 属が優勢化し *Proteus* 属および *Enterococcus* 属が検出されなかったことは塩分の影響以外の要因によるものと考えられ、イカ魚醤油の成分特性や菌叢遷移そのものが *Staphylococcus* 属の優勢的生育に適した環境であると考えられる。ただし、3%濃度では *Staphylococcus* および

Table 1. 16S rDNA-based species identification of the strains isolated from fish sauce

Fermentation time (d)	Salt concentration in fish sauce (%)	Number of strains	% of total identification	Species identified
9	0	10	60	<i>Proteus</i> sp.
			30	<i>Enterococcus</i> sp.
	3	23	10	<i>Staphylococcus</i> sp.
			61	<i>Staphylococcus</i> sp.
			13	<i>Proteus</i> sp.
			13	<i>Tetragenococcus</i> sp.
			9	<i>Vagococcus</i> sp.
			4	<i>Enterococcus</i> sp.
	5	22	55	<i>Staphylococcus</i> sp.
			23	<i>Tetragenococcus</i> sp.
14			<i>Proteus</i> sp.	
9			<i>Vagococcus</i> sp.	
10	4	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.	
47	0	7	86	<i>Staphylococcus</i> sp.
			14	<i>Tetragenococcus</i> sp.
	3	17	77	<i>Tetragenococcus</i> sp.
			24	<i>Staphylococcus</i> sp.
	5	17	65	<i>Tetragenococcus</i> sp.
			35	<i>Staphylococcus</i> sp.
	10	12	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
	15	7	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
	20	5	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
	30	5	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
120	0	6	100	<i>Staphylococcus</i> sp.
			100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
	3	20	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
			100	<i>Tetragenococcus</i> sp.
5	19	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.	
		100	<i>Tetragenococcus</i> sp.	
10	11	100	<i>Tetragenococcus</i> sp.	

Tetragenococcus 属の検出比率が逆転しており、低塩濃度でも塩分の存在が *Tetragenococcus* 属細菌の優勢化を後押しすると考えられた。*Tetragenococcus* 属細菌は耐塩性・好塩性乳酸菌に分類され、魚醤油、魚類糠漬けあるいは醤油・味噌のような塩蔵熟成を行う発酵食品において乳酸酸性の環境を作りだし発酵環境と呈味性を整える有益細菌であることが多数報告されている^{8,9)}。塩分濃度を適切に維持することで本属細菌の生育を促すことが、塩分添加の大きな理由といえる。しかし、本属はプラスミド性のヒスチジン脱炭酸酵素を株によっては保持することも知られており、魚醤油をはじめとする水産発酵食品中でのヒスタミン生成の原因ともなるため、本属細菌を精密に微生物制御する方法の開発が精力的に行われている¹⁰⁻¹²⁾。

3. 2 Illumina MiSeq による 16S rDNA 菌叢網羅解析

生菌の把握を行ったのち、同一のサンプル群から細菌ゲノム DNA を直接抽出し、バーコードタグを付したプライマーにて 16S rDNA の増幅を行い Illumina MiSeq を用いた菌叢解析に供した。解析の際は、MiSeq のリード長に適合した可変領域 V4 を含む断片を増幅して用いた。属レベルでの系統解析の結果、9 日目のサンプル (Fig. 3) については様々な原料由来と考えられる菌種が存在し、特に 0% 塩分濃度においては生菌分離の結果と符合し *Proteus*

属 (全細菌叢の約 60% を占有) および *Enterococcus* 属 (2.5~22% を占有) のリードが多く得られた。一方、同日のサンプルにおいて 3% 塩分含有試験区では *Staphylococcus* が最優勢であり、実に 89~98% を占有する結果となった。このことから、低濃度の塩分を添加した際に熟成初期において早くも菌叢の様相に大きな変化がもたらされることが示唆された。5% 試験区ではさらに菌叢は多様となり、*Escherichia*、*Pseudomonas*、*Acinetobacter* などのリードが数% ずつ見られたが、もっとも多くの占有率を示したのは *Mycoplasma* であった (36~54%)。10~20% 試験区では *Mycoplasma* のリードは減少するとともに *Corynebacterium* 属のリードが増え、7.5~37% の占有率を示した。このように、イカ魚醤油の熟成初期には塩分濃度のわずかな違いによって菌叢が大きく変化することがあらためて示唆された。

一方、仕込み後 47 日目 (熟成中期) のサンプルの菌叢解析を行ったところ、占有菌種の内訳は大幅に変化し、*Staphylococcus* もしくは *Tetragenococcus* が大部分を占め、0% 塩分濃度試験区のみにおいて *Enterococcus* および *Escherichia* のリードが多く検出されるに留まった (Fig. 4)。すなわち、発酵初期に存在した *Proteus*、*Yersinia*、および *Mycoplasma* 等の夾雑細菌は駆逐され、耐塩性・好塩性

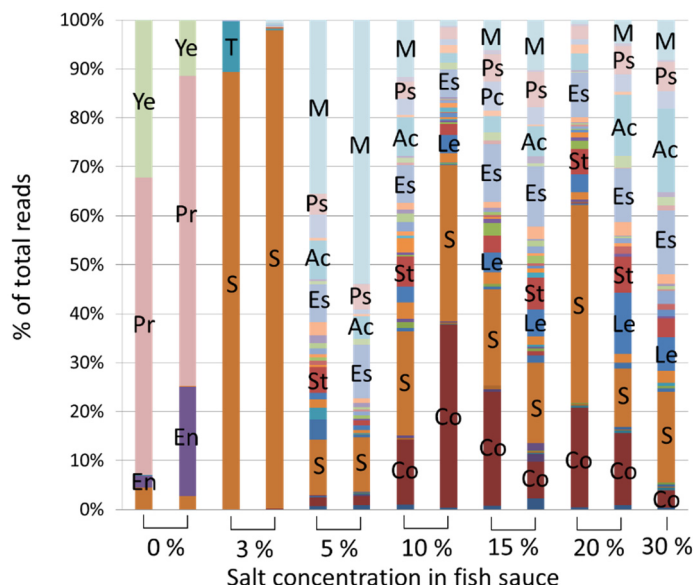


Fig. 3. Bacterial flora compositions in fish sauces at 9 days after start of fermentation (initial maturation stage). Pr, *Proteus*; Ye, *Yersinia*; En, *Enterococcus*; S, *Staphylococcus*; T, *Tetragenococcus*; M, *Mycoplasma*; Ps, *Pseudomonas*; Pc, *Pseudomonadaceae*; Ac, *Acinetobacter*; Es, *Escherichia*; St, *Streptococcus*; Le, *Leuconostoc*; Co, *Corynebacterium*.

細菌が優先的に生育していく様相が伺われた。0%試験区においても腸内細菌科のグラム陰性細菌である *Escherichia* 属のリードは残存したものの、*Staphylococcus* 属の生育に伴って大部分の腐敗的に働く細菌群との入れ替わりが起こったと考えられる。単離培養法での同定結果でも 0%試験区では *Staphylococcus* 属が優先的に分離されており、MiSeq による解析の結果と符合した。熟成後期 (120 日目) の解析結果 (Fig. 5) では同じく *Staphylococcus* 属および *Tetragenococcus* 属の占有率が高かったが、特に高塩濃度魚醤油中での *Staphylococcus* の占有率の低

下が見られ、*Proteus*、*Escherichia*、および *Enterococcus* 属のリード占有率は増加していた。この原因は不明であるが、塩分 10%以上の高濃度環境下でこれらの細菌群が再び生育することは考えにくいいため、熟成中期から後期にかけて *Staphylococcus* 属が死滅・消滅するのに伴って、サンプル中に残存した上記細菌群の死菌体の DNA が検出された可能性もある。上述のように 15%以上の高い塩濃度のサンプル群では生菌数自体が極めて制限されており、少ない菌数の微生物群集の中で検出率の微妙な差異が表れた可能性も示唆される。

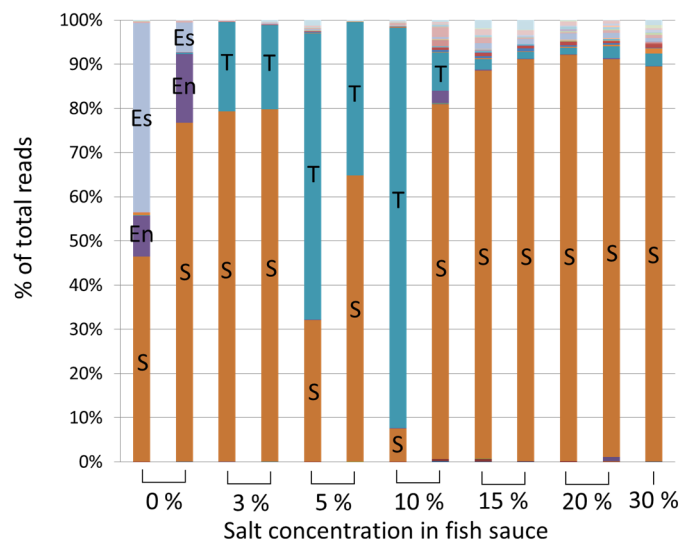


Fig. 4. Bacterial flora compositions in fish sauces at 47 days after start of fermentation (middle maturation stage). En, *Enterococcus*; S, *Staphylococcus*; T, *Tetragenococcus*; Es, *Escherichia*.

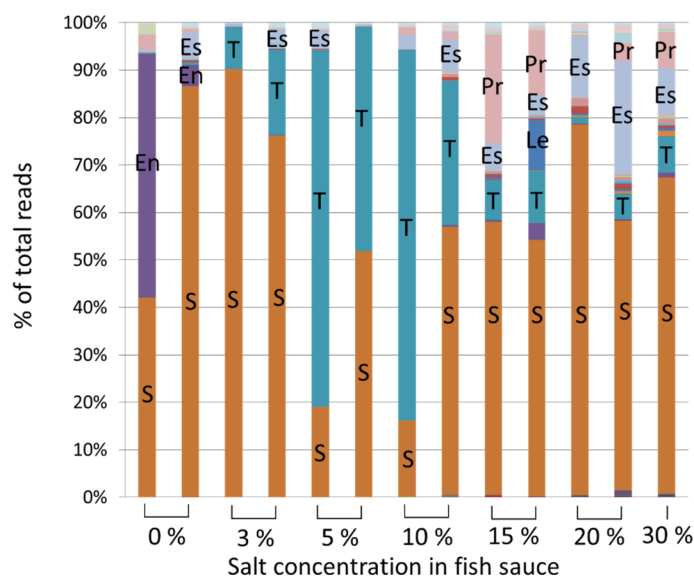


Fig. 5. Bacterial flora compositions in fish sauces at 120 days after start of fermentation (late maturation stage). En, *Enterococcus*; S, *Staphylococcus*; T, *Tetragenococcus*; Es, *Escherichia*; Pr, *Proteus*; Le, *Leuconostoc*.

3.3 汚染モデル魚醤油の菌叢解析

次に、あらかじめ微生物汚染を施した魚醤油を様々な塩分濃度にて仕込み、汚染度が熟成にもないどのように低減されるかをモニタリングした。汚染細菌として、芽胞菌 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NBRC13719 株、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* NBRC 100911 株、腸内細菌として *Escherichia coli* MG1655 株、低温増殖可能な腐敗細菌として *Pseudomonas putida* KT2440 株、海洋性の腐敗細菌として *Shewanella putrefaciens* NBRC3908

株、*Vibrio alginolyticus* NBRC15630 株、およびヒスタミン生成の原因ともなる耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus muriaticus* JCM10006 株の 7 菌株を使用し、 2×10^5 cfu/ml となるよう調整のうえ仕込み時に魚醤油中に投入した。本実験は上記と同じく Illumina MiSeq を用いて 16S rDNA V4 領域を網羅的に解析することにより行った。仕込み後 21 日目および 50 日目にサンプルを採取し、菌叢解析に供した結果を Fig. 6 および Fig. 7 に示した。塩分濃度 0~

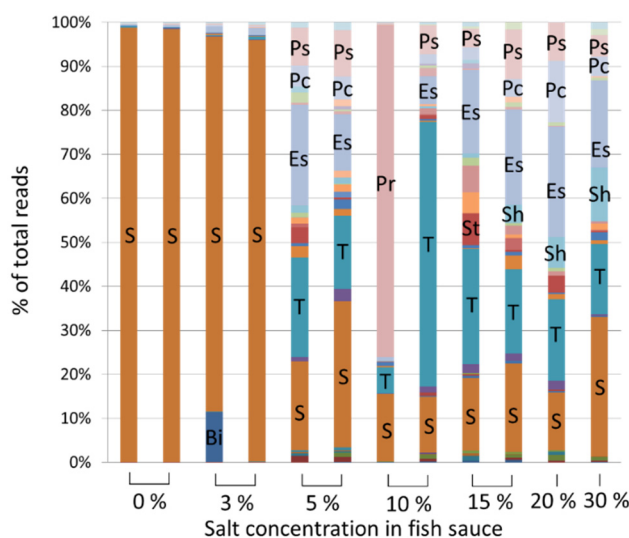


Fig. 6. Bacterial flora compositions in fish sauces with inoculation of putrefactive bacteria, at 21 days after start of fermentation. S, *Staphylococcus*; T, *Tetragenococcus*; Bi, *Bifidobacterium*; Es, *Escherichia*; Pr, *Proteus*; Ps, *Pseudomonas*; Pc, *Pseudomonadaceae*; Sh, *Shewanella*; St, *Streptococcus*.

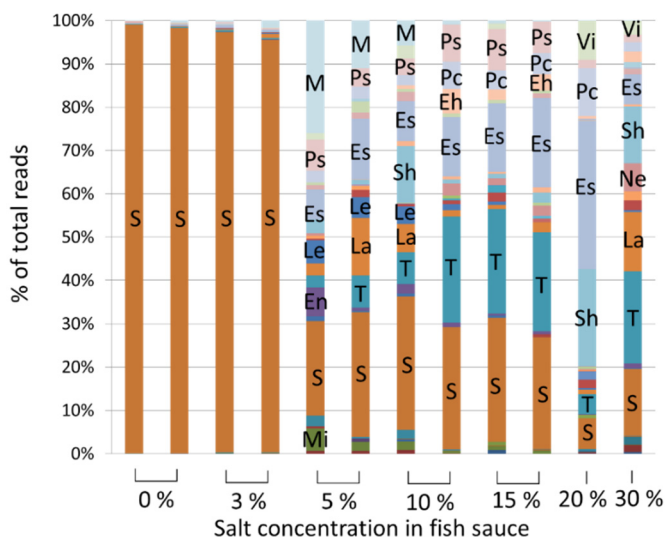


Fig. 7. Bacterial flora compositions in fish sauces with inoculation of putrefactive bacteria, at 50 days after start of fermentation. S, *Staphylococcus*; T, *Tetragenococcus*; Eh, *Enhydrobacter*; En, *Enterococcus*; Es, *Escherichia*; La, *Lactobacillaceae*; Le, *Leuconostoc*; Mi, *Microbacteriaceae*; M, *Mycoplasmataceae*; Ne, *Neisseriaceae*; Ps, *Pseudomonas*; Pc, *Pseudomonadaceae*; Sh, *Shewanella*; St, *Streptococcus*; Vi, *Vibrio*.

3%において21日目および51日目の両方で90%以上を占めたのは *Staphylococcus* 属であり、上述の通り汚染菌を接種しない自然発酵でも3%以下の低塩濃度で *Staphylococcus* が熟成とともに優勢化した結果と符合していた。5%以上の塩分濃度サンプル群では多種類の細菌群のリードが検出され、特に5%濃度、仕込み後50日目の魚醤油において自然発酵魚醤油と同様に顕著な *Mycoplasma* のリード数増加が見られた。本菌は仕込み時に接種していないため、やはり5%塩分濃度では原料中に含まれる本菌が一部増殖している可能性も否定できない結果となった。

3. 4 塩分濃度の重要性～魚醤油の微生物制御に関するまとめと課題・展望

上記のように単離培養法および MiSeq を用いて 16S rDNA ベースで魚醤油菌叢と塩分濃度の関連性を探るための研究を遂行し、全ての菌叢遷移に関する情報を得るには程遠いものの、イカ内臓を原料とする魚醤油の菌叢・塩分相関についてある程度の概観を掴むことができた。塩分濃度5%以下では熟成初期において腸内細菌科のグラム陰性細菌も一過的に生育すること、その後 *Staphylococcus* 属細菌が優勢化することや、10%塩分濃度周辺におそらく制菌効果を安定的に得るための分水嶺が存在すること、15%以上の高塩分濃度では殆どの生菌が抑制されながらも *Tetragenococcus* 属乳酸菌や *Staphylococcus* 属細菌が残存すること、5%塩分濃度で特徴的に *Mycoplasma* のリードが検出されることなどが明らかになった。これらの知見の中には、特に耐塩性乳酸菌の増殖等について既知の事実も多数含まれているものの、次世代シーケンス機による菌叢解析が興隆を迎えている中で、塩蔵発酵食品中の塩分濃度と菌叢制御の本質的な関係性について精度よく明らかにすることができると考えて本課題を遂行したものである。塩分濃度15%以上では本来塩蔵のもつ制菌効果が強く表れることが本研究からも明らかであり、時代が進展して無菌的に魚醤油製造を行えるような設備が整わない限りは、昨今の減塩ブームの中でもこの周辺の塩分濃度を堅持することは必須であると考えられる。塩蔵と安定食品保蔵の関係は人類の長い歴史の中で食文化の発展とともに大切に温められてきたものであり、その価値を改めて再発見する意味においても、本研究成果が微力でも塩蔵食品の微生物制御への

貢献となればこれ以上の幸いはないと考えている。

本研究の遂行にあたり協力をいただいた、石川県立大学食品科学科食品微生物学研究室の中村早希さんに感謝いたします。最後に、御助成をいただき研究をさせて頂く機会を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心から感謝いたします。

4. 文献

- 1) 福田裕、山澤正勝、岡崎恵美子 監修 (2005) 全国水産加工品総覧. 光琳.
- 2) 平塚聖一 編著 (2014) 地域水産物を活用した商品開発と衛生管理. 幸書房.
- 3) 野田文雄 (1993) 東南アジアの魚醤油. 日本醸造協会誌 88, 531-536.
- 4) Ruddle, K., Ishige, N. (2009) Globalization, Food and Social Identities in the Asia Pacific Region, Farer, J. (ed.). Sophia University Institute of Comparative Culture. (URL: <http://icc.fl.sophia.ac.jp/global%20food%20papers/>)
- 5) 中里光男、小林千種、山嶋裕季子、立石恭也、川合由華、安田和男 (2002) 魚醤油中の揮発性塩基窒素及び不揮発性アミン類の分析. 東京衛研年報 53, 95-100.
- 6) Michihata, T., Yono, T., Enomoto, T. (2002) Volatile compounds of headspace gas in the Japanese fish sauce Ishiru. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 2251-2255.
- 7) 横山理雄、藤井建夫 編著 (1996) 伝統食品・食文化 in 金沢. 幸書房.
- 8) Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y., Yongsawatdigul, J. (2011) Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. J. Agric. Food Chem. 59, 8401-8408.
- 9) Masuda, S., Yamaguchi, H., Kurokawa, T., Shirakami, T., Tsuji, R.F., Nishimura, I. (2008) Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. Int. J. Food Microbiol. 121, 245-252.
- 10) 木村メイコ、舊谷亜由美、福井洋平、柴田由起、根井

大介、矢野豊、里見正隆(2015)魚醤油発酵時のヒスタミン蓄積に関わる原因菌の同定および乳酸菌発酵スターター接種によるヒスタミン蓄積抑制効果について. 日本水産学会誌 81, 97-106.

- 11) Satomi, M., Furushita, M., Oikawa, H., Yoshikawa-Takahashi, M., Yano, Y. (2008) Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase

gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. Int. J. Food Microbiol. 126, 202-209.

- 12) Kuda, T., Izawa, Y., Ishii, S., Takahashi, H., Torido, Y., Kimura, B. (2012) Suppressive effect of *Tetragenococcus halophilus*, isolated from fish-nukazuke, on histamine accumulation in salted and fermented fish. Food Chem. 130, 569-574.

Microbiological Analysis and Breeding toward Improvement of Quality and Stability of Salt-Cured Fermented Fish Products

Takashi Koyanagi

Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University

Summary

Salt-curing of fermented fish products is an important manufacturing process to repress putrefaction and contamination by undesirable microorganisms, simultaneously providing a taste improvement and sufficient length of preservation period. Nowadays, however, many food manufacturers are going to reduce the concentration of salt in their products, with an increasing concern for unhealthy aspects of salt such as high blood pressure. This reduction of salt concentration is sometimes resulting in the unexpected food poisoning such as the case for Japanese pickles contaminated with the pathogenic *Escherichia coli* strains. In light of this situation, it is now needed to carefully review and reinvestigate the true role of salt in food production and preservation through the scientific approach, for the future safety of the salt-cured fermented foods. In this study, fish sauce, which normally contains not less than 20 % of salt, was investigated for the change of microbiota depending on the various salt concentrations (0-30 (w/w) %). The samples were evaluated for 16S ribosomal DNA-based microbiota analyses, as revealed by culture-based strain isolation and Illumina MiSeq-based next generation sequencing analyses. Gram-negative putrefactive bacterium *Proteus* sp. and enterococci, possibly originated from squid organ, were isolated from the fish sauces with the salt concentrations less than 5 %, thus the spoilage was ongoing under low salt concentrations. Ten % salt could not stably repress the bacterial growth but 15 % salt was enough effective to reduce the viable counts of microorganisms, indicating that limiting point for bacterial control exists around this range. *Tetragenococcus* and *Staphylococcus* were dominantly isolated from the fish sauces containing more than 15 % salt, but the viable counts were quite low at these high salt concentrations. The MiSeq dataset revealed that *Mycoplasma* unexpectedly increased in the fish sauces with 5 % salt concentration, indicating that they might specifically grow under this condition. Taken together, this study provided rational information that microbiota dynamically changed depending on the salt concentration, and that the concentration around 15 % is necessary to stably exert the controlling effect on bacterial growth in squid organ-based fish sauce.