

## 川内(せんで)きびなご鮓の発酵過程における美味しさと微生物の関わり ～海洋性微生物について～

竹下 温子<sup>1)</sup>，松元 圭太郎<sup>1)</sup>，立石 百合恵<sup>2)</sup>，森中 房枝<sup>1)</sup>

### 要 約

昨今、日本の教育の中で、食育が重要視され、小さいころからの食生活の育成に力を入れているが、その食育の一環として、地産地消と地場の活性をテーマに鹿児島県薩摩川内市の甌島で非常に豊漁である「きびなご」と、薩摩川内市の食材を使った特産品を作ろうと、鹿児島県薩摩川内市にある医療法人九十九会 関小児科医院の管理栄養士さんが立ち上がり、川内きびなご鮓という、鹿児島県の郷土料理である酒寿司をアレンジした特産品を考案した。この「川内きびなご鮓」は「食&アグリ・マッチングフェア」コンテストに入賞し、高い評価を得た一品である。

我々はそのきびなご鮓の製造工程のひとつである、きびなごの昆布締めめの保存日数（発酵過程）における味の変化について研究依頼を受け、食品の味を決める遊離アミノ酸の測定と発酵過程における微生物の変化について調べることを目的とし、16S rRNA 遺伝子による菌の同定を行っている。本研究は、その目的の中の一つとして、きびなごにもともと存在していると考えられる海洋性の菌について、保存日数における菌変化の有無を菌数およびコロニー観察・グラム染色にて比較・検討した結果を報告する。

保存日数における菌の変化を調べるため、味付けをせず、食塩水に浸漬後、真空保存したきびなご（サンプル①）、調味後真空し1週間冷蔵保存したもの（サンプル②）、調味後真空し2日間冷蔵保存後、チルドにて60日間保存したもの（サンプル③）、調味後真空し1晩冷蔵保存後、チルドにて90日間保存したもの（サンプル④）の4サンプルを提供して頂き、段階希釈後、一般海洋性細菌用培地である Zobell 培地にて菌の培養を行った。

その結果、①は100CFU/mlの菌が増殖し、④は面白いことに希釈倍数の高い $10^{-4}$ のみに30万CFU/mlの菌が増殖した。何かの影響を受け、希釈倍率が高くなってから菌が増殖してくることもあるため、このプレートからも50株釣り菌した。④については海洋性の菌でない可能性もあり、発酵食品に非常に多く存在する乳酸菌の可能性も示唆されたため、GYP 白亜寒天培地にて刺針による培養を行った。その結果、非常に弱い、クリアゾーンを形成しており、酸を作り出す菌であることがわかった。②、③については、Zobell 培地に菌を観察することができなかった。標準寒天培地による生菌数については、保存期間が長いものほど、菌が増殖していることがわかった。

真空後のチルド保存が90日の④は試食にて非常に美味しいと評判のあった昆布締めであり、生菌数や海洋性の菌数からみても一番菌が増殖していた。次に、60日間チルド保存の③についても生菌数は非常に多かったが、海洋性の菌は増殖されてこなかった。これらのことより、海洋性の菌以外のものが優勢的に増えてしまった③より、海洋性の菌も増殖することができる環境下であった④の方が旨味や風味が増していると考えられ、海洋性の菌が水産食品の発酵に重要な役割を与えている可能性が示唆された。

**キーワード：**微生物，発酵食品，郷土料理，16S rRNA 遺伝子

### はじめに

きびなごは学名 *Spratelloides gracilis* といい、ニシン目・ニシン科に分類される魚の一種で、長崎県の五島では「ジャムキビナゴ」長崎市では「カナギ」

と呼ばれ、静岡県の沼津、静浦地方では「ハマゴ」「ハマゴイワシ」「キミイワシ」などと呼ばれている。その分布はインド洋と西太平洋の熱帯・亜熱帯域に広く、日本では鹿児島県、長崎県、高知県といった暖流に面した地域でまとまった漁獲があり、特に鹿児島では薩摩川内市の甌島で多く漁獲される。小魚で傷みが早いことから漁獲地以外に流通することは少なく、

1) 鹿児島純心女子大学看護栄養学部健康栄養学科

2) 医療法人九十九会関小児科医院栄養科

鹿児島ではきびなごを刺身として食べるほど、豊漁で新鮮なうちに供される<sup>1,2,3)</sup>。きびなごの刺身は、鹿児島県の郷土料理の一つで、酢味噌で供されるものが多い。

鹿児島の郷土料理は他県に比べ多種多彩であるが、その中で一番豪華な酒ずしは、鹿児島県に伝わる伝統製法食品のひとつである地酒（灰持酒）を使った寿司である。三国名勝図会（江戸時代後期に薩摩藩が編纂した薩摩国、大隅国、及び日向国の一部を含む領内の地誌や名所を記した文書）の中に「甞府の鮓は他邦の鮓の比にあらず。駿州古吉田に於いて、これに倣ふて製し、薩摩と名づくといえども、其製法得ざれば、甞府の鮓とは大に異なり」とあり、藩政時代から薩摩の酒ずしは全国に知られていたほど有名な郷土料理であった<sup>4)</sup>。

このように、鹿児島には古くから伝わる伝統食品および郷土料理が多数ある。今回我々が依頼を受けた「川内きびなご鮓」はこのような、郷土料理および伝統食品また、地場食材をふんだんに使用した一品であり、かごしまの逸品コンテスト入賞・薩摩川内市特産品コンクール優秀賞を受賞するなど、薩摩川内市の新しい特産品となっている。

我々はこの「きびなご鮓」の製造工程の一つである、きびなごの昆布締め保存過程における海洋性微生物の変化について調べることを目的とした。

### 実験材料及び方法

きびなごの昆布締め保存状態と同じ条件下で微生物を培養する必要があるため、3.3%の塩濃度下で、嫌気培養を行った。

#### 1. 実験材料

保存日数における菌の変化を調べるため、味付けをせず、食塩水に浸漬後、真空保存したきびなご(①)、調味後真空し1週間冷蔵保存したもの(②)、調味後真空し2日間冷蔵保存後、チルドにて60日保存したもの(③)、調味後真空し1晩冷蔵保存後、チルドにて90日保存したもの(④)の4サンプルを提供して頂いた。実験に使用するまでは全て-80度にて保存していた。

#### 2. サンプルの段階希釈

(以後の実験方法はすべて、滅菌された器具・試薬を用いた。)

4サンプルを10g測りとり、3.3%NaCl溶液とともにSTOMACHER Bags (Seward社)に入れ、STOMACHER400 (Seward社)にて30秒攪拌した。これを10倍の段階希釈で $10^{-6}$ まで希釈しサンプル溶液とした。

#### 3. 培地・試薬の組成および調整法

標準寒天培地、その他試薬の組成・調整は前報<sup>5)</sup>に従った。一般海洋性細菌用培地であるZobell培地は藤島ら<sup>6)</sup>の組成に従い食塩水のみ3.3%のものを使用した。

#### 4. 嫌気培養および菌数測定、菌の分離・単離法

培養は、3.の組成によって段階希釈ごとに前報<sup>5)</sup>に従い混釈培養をおこなった。本研究では、真空での保存期間における菌の変化を調べるため、アネロパック(三菱ガス株式会社)およびアネロパックジャー(三菱ガス株式会社)を用いて嫌気培養をおこなった。菌数測定、菌の分離・単離法は前報<sup>5)</sup>に従った。

#### 5. コロニー観察およびグラム染色法

単一になった菌について、コロニーの観察を行い、グループ分けし、その後代表菌株についてグラム染色<sup>7)</sup>をおこなった。

#### 6. Benzyl chloride 法によるDNA抽出および精製

DNAの抽出および精製は、Benzyl chloride法<sup>8)</sup>による変法で行った。

#### 7. 1.0%アガロースゲル電気泳動による高分子DNAの確認

高分子DNAの確認は前報<sup>9)</sup>に従って行った。

#### 8. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting) 法による菌の分類分け

RAPD法<sup>10)</sup>による菌のグループ分けは前報<sup>11)</sup>に従って行った。

### 結果および考察

#### 1. 保存期間における生菌数、海洋性菌数の変化

図1に示した通り、生菌数は冷蔵・チルド保存の日数が長い③、④ほど、菌数が爆発的に増えていた。またZobell培地により増殖した海洋性の菌については調味せずに真空し一日冷蔵保存した①が $141\text{CFU/ml}$ 存在し、調味後、冷蔵・チルド保存が1週間の②、調味後、冷蔵・チルド保存が60日間の③については菌が生えてこなかった。しかし、調味後真空し、冷凍・チルド保存が90日間の④については $30\text{万CFU/ml}$ の菌の増殖があり、海洋性の菌については保存日数が長いほど菌数が増えているわけではなく海洋性微生物が育つような培養の条件が揃った時に爆発的に増えることがわかった。

#### 2. Benzyl chloride 法による高分子DNAの抽出

図3に示すとおり、単離したすべての菌において、高分子のDNAを抽出することができた。

#### 3. RAPD 法による菌株グループ分けの検討

西本・鳴戸らが行った鰹の酒盗菌分類分けの方法であるRAPD法<sup>12,13)</sup>に従い、PCR反応を試みたが、遺伝子を増幅することができなかった。DNA希釈濃度や、primer、温度条件などの変更を試みたが、結

果を得ることができなかった。よって、今後もう一度、DNA 濃度, primer, 酵素などの条件変更の検討を行うことが重要と考えられた。今回 RAPD 法による分類わけができなかったため、コロニー形状および性

状による菌のグループわけを行った。また西本・鳴戸らが、コロニー形状および性状によって分類した菌を 16S rRNA 遺伝子にて同定を行っていたため、この結果を基準として、菌種を推測することとした。

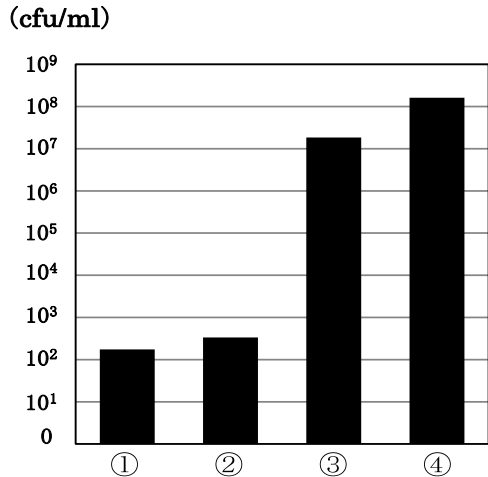


図 1. 保存期間における生菌数の変化

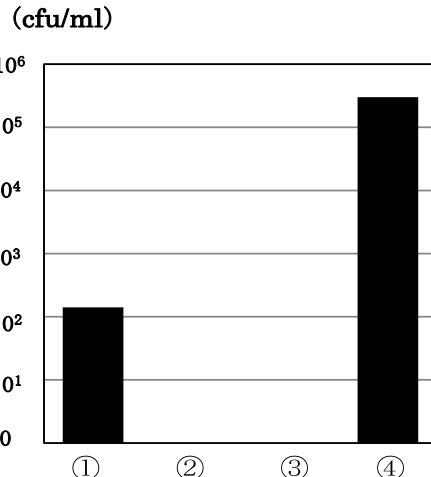


図 2. Zobell 培地における菌数変化

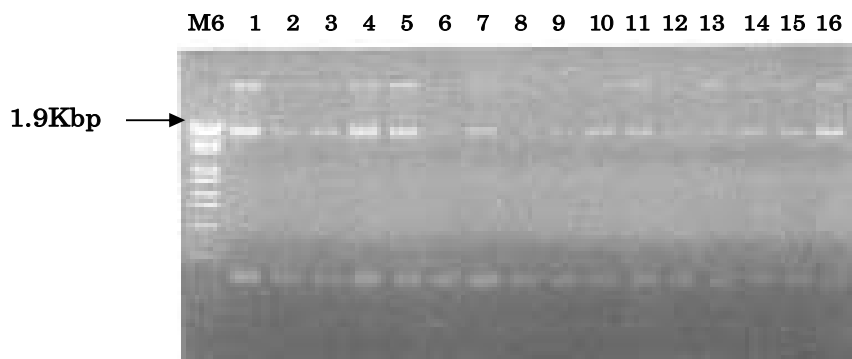


図 3. 1%アガロース電気泳動による高分子 DNA の確認

表 1. 各保存期間における釣菌 50 個中のそれぞれの培地における菌の性状

	①の釣菌 (50/50)		④の釣菌 (43/50)		
	コロニー形状(%) Zobell培地	グラム 染色	コロニー形状(%) Zobell培地	コロニー形状(%) GYP培地	グラム 染色
白色 まる	46	陽性 球菌	100	-	陽性 球菌
白色 帯	6	陽性 球菌	-	-	-
濃い オレンジ	4	陽性 桿菌	-	-	-
肌・黄色 まる	24	陽性 球菌	-	-	-
黄白 マーブル	-	-	-	100	陽性 球菌
発育 不全	20	-	-	-	-

#### 4. 保存日数別 50 株の釣菌におけるコロニー形状および性状によるグループ分け

海洋性菌が生えてきた①, ④について釣菌・植菌をした 50 株 (④については 43 株) の菌について, その単一コロニーの性状と形状を表 1 にまとめ, コロニー形状による分類分けを行った。①の海洋性の菌については,  $10^{-1}$  に生えてきたコロニーの中から, 50 株釣菌した結果, コロニー形状は白色・丸, 白色・帯, 濃いオレンジ, 肌・黄色・丸, 発育不全の 5 形態に分かれた。このうちの 20% にあたる 10 株の菌については, 非常に弱く, 平面寒天培地上で発育することができなかった。

一番発育してきた形状は白色・丸で 46% 存在し, 次に肌・黄色・丸が 24% と多かった。また白色で帯状の非常に強い菌が 6% 存在し, 濃いオレンジ色の菌が 4% 存在した。どれもグラム染色の結果はグラム陽性であり (図 4), 濃いオレンジ色以外の菌はすべて球菌であることがわかった。また濃いオレンジ色の菌は, 桿菌であることが判明した (図 4)。

次に, ④の海洋性の菌については  $10^{-5}$  に生えてきたコロニーの中から, 取れるすべてのコロニーについて釣菌し, 43 株の菌について, その形状と性状を示した (表 1)。その結果, ④の菌について Zobell 培地では白・丸の形状のみが 100% 存在していた。ただし, この④の菌については  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  の段階希釈培養をおこなっているのにも関わらず,  $10^{-5}$  のみに菌が発育したため, 海洋性の菌以外のものである可能性が示唆され, 発酵食品で一番多く存在する乳酸菌の可能性も考えられ, GYP 白亜寒天培地へ刺針による培養を行った (図 5)。その結果, コロニーの色彩としては, 黄色と白色のマarmorを呈し, 非常に弱い酸を出していることを確認した。GYP 白亜寒天培地で酸を出すものは総称して乳酸菌といわれるため, 乳酸菌である可能性が高くなった。しかしながら, 西本・鳴戸らが鯉の酒盗から海洋性の菌を単離し, コロニー形状による菌の分類および 16S rRNA 遺伝子の同定を行っている結果と比較すると, Zobell 培地では白色・丸のコロニーであった菌について, GYP 白亜

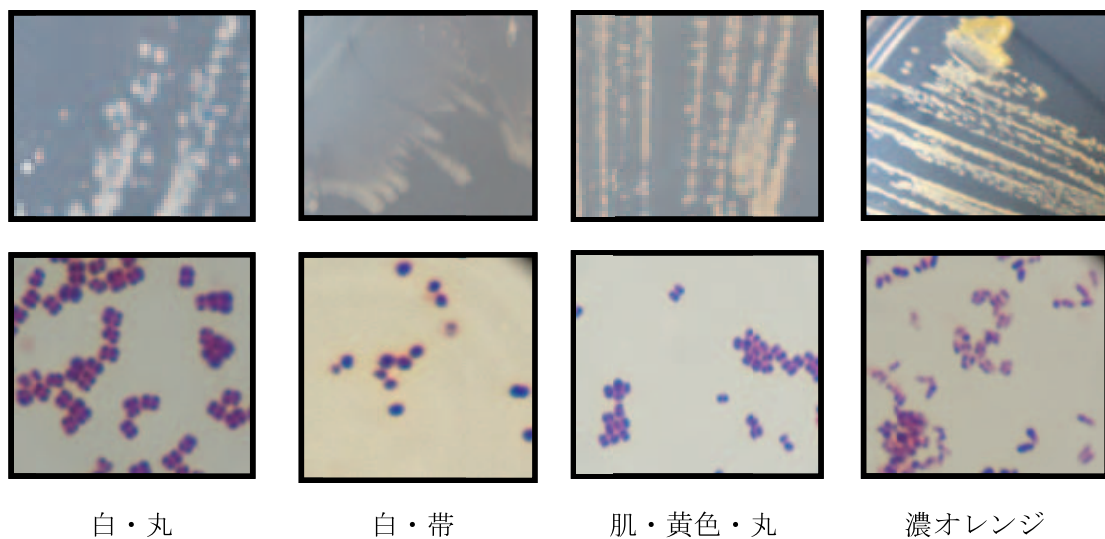


図 4. 菌の形状 (上) およびグラム染色の結果 (下)

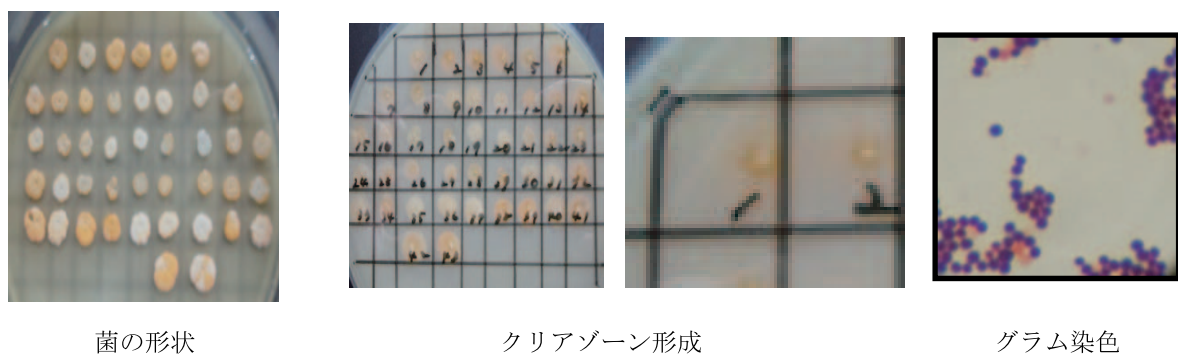


図 5. ④の菌の GYP 白亜寒天培地における菌の形状およびグラム染色の結果

寒天培地では、黄・白のマーブルに呈し、酸を出している菌を、16S rRNA 遺伝子にて *Staphylococcus chonii* と同定していた。西本・鳴戸らのコロニー結果と今回得られた④の海洋性菌の形状が非常に似ていること、また *Staphylococcus chonii* がグラム染色で陽性の球菌であることや、通気嫌気性菌であることなどから、今回の培養条件でも生育可能であるため、本研究にて Zobell 培地によって得られた④の菌は *Staphylococcus* 属である可能性も示唆された。

*Staphylococcus* 属は水産物の発酵食品で、旨味を増し、香りを呈する種もあり、水産物系の発酵食品に欠かせない菌である<sup>14)</sup>。これらのことから④の90日保存については、試食の評価にて、うま味が増して美味しくと評判のあった昆布締めであるため、*Staphylococcus* 属である可能性がより高いと推察された。もしそうであれば、GYP 白亜寒天培地にて、クリアゾーンを形成する *Staphylococcus* 属がいることになり、新たな知見となる。

今後は、乳酸菌の同定、遊離アミノ酸の測定を続けて行い、今回、同定をすることのできなかつた④の菌について本当に *Staphylococcus* 属なのか明らかにする必要がある。またどのような条件により、③と④のように微生物に違いが出てきたのかを、まずは考えられる真空の度合いを調整することで、水産食品の旨味・香りに関係する *Staphylococcus* 属の生育に変化があるかどうかを検討し、より美味しい昆布締めをつくる条件を模索していく必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) 阿部宗明 他：現代おさかな事典 魚場から食卓まで：301～303
- 2) 多紀保彦：食材魚具大百科①，平凡社：95
- 3) 吉野昇雄：鮓・鮭・すし～すしの事典～：166～167, 2003
- 4) 蟹江松雄 他：鹿児島県の伝統製法食品：94～102, 2001
- 5) 相生衣理 他：福山黒酢の仕込み方法と発行過程におけるエタノール量、酸度、総窒素量、アミノ酸及び微生物の変化．地域・人間・科学 5:145-160, 2000
- 6) 藤井智幸 他：塩ストレス環境下での VNC 食品微生物の単離とその挙動．ソルト・サイエンス研究財団 2：221 - 229, 2005
- 7) 瀬戸口賀子 竹下温子：平成 21 年度 食品衛生学実験書：10～14
- 8) Zhu,H.,F.Qu, and L.Zhu(1993):Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Res.21：5279-5280
- 9) 竹下温子：鹿児島黒豚の SLA-DR1 遺伝子の分析 地域・人間・科学 5：145 - 160, 2001
- 10) 光岡知足 他：腸内フローラとプロバイオティクス：腸内フローラシンポジウム 5(5), 100:57-73 , 1998
- 11) 瀬戸口賀子 他：福山壺づくり純米黒酢の発酵過程における一般成分および乳酸菌の動態変化～2005 年から 2008 年まで 4 年間の総まとめ～鹿児島純心女子大学看護栄養学部紀要 Vol. 14：41-47, 2010
- 12) 鳴戸理沙：酒盗の製造工程における酒盗菌の分離と 16S rDNA 塩基配列を用いた菌の識別．卒業論文, 2005
- 13) 西本恵美：酒盗発酵完成品における酒盗菌の分離と 16S rDNA 塩基配列を用いた菌の識別．卒業論文, 2005
- 14) 藤井 建夫：魚の発酵食品 成山堂書店, 2001

## The relationship between supreme taste and micro organism in during “Sende Kibinago Sushi” fermentation

Haruko Takeshita<sup>1)</sup>, Keitaro Matumoto<sup>1)</sup>, Yurie Tateishi<sup>2)</sup>, Fusae Morinaka<sup>1)</sup>

1) Faculty of Nursing and Nutrition, Kagoshima Immaculate Heart University

2) Department of dietitian, Seki pediatrics a doctor's office

### Abstract

Dietary education has been regarded as important, and lays emphasis on upbringing of child's eating habits in recent years in Japan. Under the theme of local production for local consumption and local promotion, a plan to make a special product, used Kibinago (*Spratelloides gracilis*) that was able to capture it abundantly on Koshiki-Island and other cooking ingredients in Satsuma-Sendai city, was carried out as a part of the dietary education. “Sende Kibinago Sushi” arranged the “Sake Zushi” which was local cooking of Kagoshima, was developed by a registered dietitian in Satsuma-Sendai city as the special product, and won prizes in food contests and got high evaluation in Kagoshima.

We are investigating that the effect of saving day of Kibinago, sandwiched between sheets of kelp that is one in process of manufacture of the Kibinago-sushi, on change of the taste. In this study, we investigated the change of the number of marine bacteria in four samples; vacuum-packed Kibinago without seasoning (sample ①), vacuum-packed seasoning Kibinago after 1-week cold storage (sample ②), vacuum-packed seasoning Kibinago after 2-day cold and 60-day chilled storages (sample ③), vacuum-packed seasoning Kibinago after 1-night cold and 90-day chilled storages (sample ④), with Zobell nutrient medium for general marine bacteria. The colonies of general marine bacteria cultured with the Zobell medium were observed in sample ① and sample ④ (100 and 300,000 cfu/mL, respectively). No colony was observed in the Zobell medium of sample ② and ③. The colonies of sample ④ were observed only in the most diluted sample (dilution ratio:10<sup>-5</sup>). On the other hand, the viable cell number cultured with standard agar nutrient medium was increased with the extension of the save days. Fifty colonies in the Zobell medium of sample ④ were picked up and cultured in glucose-yeast extract-peptone (GYP) chalk agar medium. All colonies cultured in the GYP medium formed clear zone slightly. The result suggested that the marine bacteria in sample ④ have acid production capacity. The bacteria identification by 16s ribosomal RNA gene analysis has been not finished, therefore, it was attempted to speculate the bacterial strain based on a classification by colony's shape in reference to previous reports identified marine bacteria in "Syuto (dish of pickled skipjack tuna entrails)" by 16s ribosomal RNA gene analysis and classification by colony's shape. The bacteria in sample ④ were speculated to belong to the genus *Staphylococcus*. The Kibinago sandwiched between sheets of kelp of sample ④ obtained highest evaluation by the tasting. The bacteria in the genus *Staphylococcus* were reported to be concerned with formation of Umami and fragrance, therefore it was considered to be indispensable to marine fermented foods. Therefore, it was speculated that the marine bacteria in sample ④ is concerned with formation of Kibinago-sushi's taste. However, further investigations are needed to identify the marine bacteria in sample ④ and to confirm the mechanism of the effect of the marine bacteria on the taste of Kibinago-sushi.

---