

〈資料〉

カツオ漬け汁に関する微生物相解析および保存性に関する研究

Research on analysis of microflora and shelf life for pickled bonito

金田一秀 三舟隆之

東京医療保健大学 医療保健学部 医療栄養学科

Kazuhide KANEDA, Takayuki MIFUNE

Division of Medical Nutrition, Faculty of Healthcare, Tokyo Healthcare University

要 旨：【目的】カツオ漬け汁について微生物相解析を行い、塩カツオの保存性について検討した。
【方法】再現実験で得られたカツオ漬け汁について、性状解析と 16S リボソーム遺伝子塩基配列解析による同定を行った。
【結果】カツオ漬け汁に存在する微生物は3%食塩を添加したブレインハートインフュージョン培地で良好な生育が見られ、乳酸菌を含む好塩菌あるいは耐塩菌が存在することを明らかにした。
【結論】本研究においてカツオ漬け汁は酸性を示し、好塩性細菌が存在することを明らかにした。したがって、カツオを高濃度食塩水に漬ける方法は、カツオの保存方法として有用であることが示唆された。

Abstract： [Purpose] We performed microflora analysis on pickled bonito and examined its shelf life.
[Method] We conducted characterization analysis and identified pickled bonito via replication using 16S rRNA gene sequence analysis.
[Result] The microbes in pickled bonito exhibited excellent growth when cultured in 3% salt-containing brain heart infusion medium. We identified the microbes to be halophilic bacteria or halotolerant bacteria, including lactic acid bacteria.
[Conclusion] We found that the medium containing the pickled bonito was acidic and contained halophilic bacteria. Therefore, this study suggested that method to soak bonito in a high concentration of the saline solution was useful as a preservation of the bonito.

キーワード：カツオ漬け汁、保存性、好塩菌

Keywords： pickled bonito, shelf life, halophilic bacteria

I. 緒言

魚の塩蔵についての歴史は古く、日本でも1000年以上前から作られており、朝廷への貢ぎ物に塩蔵魚が使われていたとされている。保存方法は極めて単純で、大がかりな施設も必要としないことから、現在でも魚介類の保存方法として広く用いられている。

都城遺跡出土の木簡には、駿河・伊豆国からの貢納品として「煮堅魚」「荒堅魚」などのカツオの加工品が見られるが、その加工法および保存性についてはいまだ不明な点が多く残されている。馬場らは、西伊豆町でカツオの伝統的製法を継承しているカネサ鰯節商店の塩鰯製造法を参考にして新たに海水に漬け込む加工法による再現実験を行い、海水に漬けて天日干ししたものが「荒堅魚」であるという仮説を提唱した¹⁾。

馬場らの再現実験で得られたカツオ漬け汁の性状解析とカツオ漬け汁から単離した微生物の16Sリボソーム遺伝子（以下16S rRNA遺伝子と略す）塩基配列解析ならびに分子系統解析を行い、カツオ漬け汁の微生物相を明らかにするとともに塩カツオの保存性について検討する。

II. 実験方法

1) 実験試料

馬場らは、近海で取れた5尾（約3kg）のカツオ（*Katsuwonus pelamis*）をそれぞれ半身、1/4と1/8に切断、カツオの頭部と内臓を除去し、3枚に下ろして背骨を除去したものを19%食塩水に漬けて天日干しを行うという手法による再現実験を行った。この再現実験で得られた漬け込み途中の漬け汁をカツオ漬け汁（B）ならびに漬け込みが終わり身を取り出した漬け汁をカツオ漬け汁（A）として実験に供した。

2) 塩カツオ漬け汁の性状解析

塩カツオ漬け汁の食塩濃度は、塩分計（アタゴ製デジタル塩分計ES-421）を用いて測定した。pHはpHメーター（堀場製F-52）を用いて試料温度20℃で測定した。一般生菌数は、標準寒天培地（栄研化学パールコア標準寒天培地）を用いて、混釈平板培養法により生菌数を測定した。

3) カツオ漬け汁中に存在する微生物の至適塩分濃度

カツオ漬け汁（B）およびカツオ漬け汁（A）1mlをそれぞれ3%食塩加ブレインハートインフュージョンブイヨン培地（以下3%食塩加BHI液体培地と略す）9mlに接種し、25℃5日間培養した。培養した

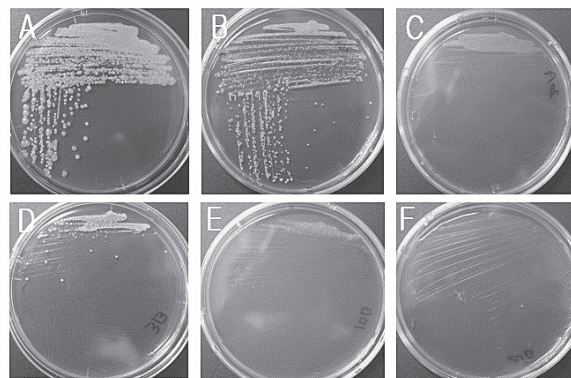


図1 カツオ漬け汁の至適塩分濃度の検討

A,B,C カツオ漬け汁（A）由来
D,E,F カツオ漬け汁（B）由来
A,D 3%食塩加TSA 寒天培地
B,E 10%食塩加TSA 寒天培地
C,F 20%食塩加TSA 寒天培地

培養液1mlを新たに3%食塩加BHI液体培地9mlに接種し、25℃5日間培養を行い生育の有無を確認した。0.5%食塩を含むトリプトソイ寒天培地に食塩濃度の終濃度が3.5%、10.5%および20.5%となるように添加調整したトリプトソイ寒天培地（以下3%食塩加TSA寒天培地、10%食塩加TSA寒天培地および20%食塩加TSA寒天培地と略す）を作成した。3%食塩加BHI液体培地において生育が見られたものについて、食塩を添加調整したトリプトソイ寒天培地を用いて25℃5日間培養、生育の有無を観察した²⁾。対照として、食塩を加えていないトリプトソイ寒天培地（以下TSA寒天培地と略す）も同様に行った。

4) 微生物の単離と同定

至適塩分濃度の実験で得られた3%食塩加TSA寒天培地および10%食塩加TSA寒天培地上の集落を釣菌し、3%食塩加ブレインハートインフュージョン寒天培地にて25℃5日間培養を行った。得られた集落の性状、グラム染色と顕微鏡観察により単一性を確認した³⁾。単一に得られた菌株のうち6株（BO-01株、BO-04株、BO-09株、BO-10株、BO-19B1株およびBO-26株）について16S rRNA遺伝子の塩基配列解析を行った。16S rRNA遺伝子の塩基配列解析は株式会社テクノスルガ・ラボに依頼して行った。

III. 結果

1) カツオ漬け汁の性状

カツオ漬け汁（B）の食塩濃度は19.0%であるのに対してカツオ漬け汁（A）では26.1%と食塩濃度の上昇が見られた。pHについてはカツオ漬け汁（B）で

pH5.446およびカツオ漬け汁（A）でpH5.726とともに酸性を示した。一般生菌数について、カツオ漬け汁（B）は 4.7×10 cfu/g、カツオ漬け汁（A）は 5.4×10^2 cfu/gであった（表1）。

表1 カツオ漬け汁の性質

	カツオ漬け汁(B)	カツオ漬け汁(A)
食塩濃度	19.0%	26.1%
pH	pH 5.446	pH 5.726
一般生菌数	4.7×10 cfu/g	5.4×10^2 cfu/g

2) カツオ漬け汁中に存在する微生物の至適塩分濃度

最も良好な生育を示したのはカツオ漬け汁（A）を画線塗抹した3%食塩加TSA寒天培地（図1A）であり、次いで10%食塩加TSA寒天培地（図1B）でも生育が見られた。その一方で、カツオ漬け汁（B）についてはカツオ漬け汁（B）を画線塗抹した3%食塩加TSA寒天培地（図1D）でのみ生育が見られた。食塩を加えていないTSA寒天培地上での生育は見られなかった。

3) カツオ漬け汁中に存在する微生物の単離、性状および同定

カツオ漬け汁から単離した微生物はグラム陰性菌の1株（BO-01株）を除き、その他5株は全てグラム陽

性菌であった。

分子系統解析の結果（表2）から、BO-01株は*Psychrobacter faecalis* Iso-46株（AJ421528）および*P. pulmonis* CCUG 46240株（NR_118026）と99.0%の相同率を示したことから*Psychrobacter* sp.と同定した。BO-04株は*Staphylococcus edaphicus* CCM 8730株（KY315825）と99.8%の相同率を示したことから*S. edaphicus*と同定した。BO-09株とBO-10株は*Bacillus anthracis* ATCC 14578株（AB190217）、*B. tropicus* MCCC 1A01406株（KJ812435）、*B. paramycoides* MCCC 1A04098株（KJ812444）、*B. nitratreducens* MCCC 1A007株（KJ812430）、*B. luti* MCCC 1A00359株（KJ812415）ならびに*B. albus* MCCC 1A02146株（KJ812440）といずれも99.9%の相同率を示したことから、BO-09株とBO-10株は*Bacillus cereus* group⁴⁾に属する*Bacillus* sp.と同定した。BO-19B1株は*Tetragenococcus halophilus* subsp. *flandriensis* T5株（EU522087）と*T. halophilus* subsp. *halophilus* JCM 5888株（AB596938）とそれぞれ99.5%と99.4%の相同率を示したことから*T. halophilus*と同定した。BO-26株は*Sporosarcina aquimarina* SW28株（AF202056）と99.2%の相同率を示したことから*Sporosarcina* sp.と同定した。

表2 カツオ漬け汁中に存在する微生物の単離、性状および同定

菌株	カツオ漬け汁由来	グラム染色※	最も相同率の高い基準株	相同率(%)
BO-01	A	-	<i>P. faecalis</i> Iso-46 <i>P. pulmonis</i> CCUG 46240	99.0
BO-04	A	+	<i>S. edaphicus</i> CCM 8730	99.8
BO-09	A	+	<i>B. anthracis</i> ATCC 14578 <i>B. tropicus</i> MCCC 1A01406 <i>B. paramycoides</i> MCCC 1A04098	99.9
BO-10	A	+	<i>B. nitratreducens</i> MCCC 1A007 <i>B. luti</i> MCCC 1A00359 <i>B. albus</i> MCCC 1A02146	
BO-19B1	B	+	<i>T. halophilus</i> subsp. <i>flandriensis</i> T5 <i>T. halophilus</i> subsp. <i>halophilus</i> JCM 5888	99.5 99.4
BO-26	A	+	<i>S. aquimarina</i> SW28	99.2

※グラム陽性(+)、グラム陰性(-)

Ⅳ. 考察

カツオ漬け汁（B）とカツオ漬け汁（A）のpHはともに酸性を示し、その塩分濃度は19.0%と26.1%と高いことから、カツオ漬け汁中に好塩性微生物の存在が予想された。本研究において3%食塩加BHI液体培地（最終塩分濃度3.5%）で良好な生育が見られたことから、カツオ漬け汁に存在する微生物は、低度好塩性細菌（大部分の海洋細菌）または中度好塩性細菌であることを明らかにした⁵⁾。カツオ漬け汁から得られた菌株の分子系統解析結果から、カツオの漬け汁に存在する微生物として*Psychrobacter*属1株、*Staphylococcus*属1株、*Bacillus cereus* group 2株、*Tetragenococcus*属1株ならびに*Sporosarcina*属1株を同定することに成功した。得られた菌株に共通する性質として好塩性または耐塩性を有していた。この結果から、得られた菌株はいずれも海産魚類または海洋環境由来であることが示唆された。さらに、醤油乳酸菌の一種として知られている*T. halophilus*はカツオ漬け汁の酸性化に寄与するとともにその他の細菌の生育を抑制することで、カツオ自身の腐敗防止に関与している可能性が示唆された。以上の結果から、カツオを高濃度食塩水に漬ける方法はカツオの保存方法として有用な手法であることを明らかにすることができた。今後、その他未同定の分離株についても同定を行いたいと考えている。

本研究は、科学研究費補助金基盤A「東ユーラシア東辺における古代食の多角的視点による解明とその栄養価からみた疾病」（課題番号：20H00033、研究代表者：三舟隆之 2022年）の研究成果の一部として実施したものである。

参考文献

- 1) 馬場基, 三舟隆之. 古代堅魚製品の再現実験『カツオの古代学』, 東京: 吉川弘文館 2023年度刊行予定.
- 2) 中川弘. 好塩細菌. 於;三瀬勝利, 井上富士男編. 食品中の微生物検査法解説書 第5版, 東京: 講談社サイエンティフィク 2005; 83-86.
- 3) Cowan ST, Steel KJ. Characters of Gram-positive bacteria and Characters of Gram-negative bacteria: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Barrow GI, Feltham RKA. 3rd ed. New York: Cambridge University Press. 2009; 50-164. doi.org/10.1017/CBO9780511527104.
- 4) Liu Y, Du. J, Lai Q, Zeng R, Ye D, Xu J, et al. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. Int J Syst Evol Microbiol. 2017;67: 2499-2508. doi:10.1099/ijsem.0.001821.
- 5) 仲山英樹. 好塩菌の塩ストレス適応機構とその応用. 生物工学. 2012; 90: 696-700.