

かぶらずしに生息する乳酸菌の分離と同定

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	入澤,友啓 田中,尚人 高野,克己 岡田,早苗
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	36巻2号
掲載ページ	p. 83-87
発行年月	2010年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



かぶらずしに生息する乳酸菌の分離と同定

入澤友啓*¹・田中尚人*²・高野克己*¹・岡田早苗*^{1,2}

*¹ 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

*² 東京農業大学応用生物科学部菌株保存室

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Inhabited in *Kaburazushi*

IRISAWA Tomohiro, TANAKA Naoto, TAKANO Katsumi and OKADA Sanae

*¹ Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

*² NODAI Culture Collection Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Kaburazushi is a traditional food produced by fermentation of turnip and yellowtail with malted rice at the low temperature in Kanazawa city and Toyama prefecture. The aims of this study are isolate lactic acid bacteria from *Kaburazushi* and to identify them based on their phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequences. Thirty nine lactic acid bacteria strains were isolated from *Kaburazushi*. *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gasicomitatum* and *Leuconostoc mesenteroides* were the predominant lactic acid bacteria in *Kaburazushi*. Characteristically, all isolates were viable at low temperature. These results suggest that the isolates are suitable as inhabitants in *Kaburazushi*.

(Received Nov. 30, 2009 ; Accepted Feb. 10, 2010)

Key words : *Kaburazushi*, Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*
かぶらずし, 乳酸菌, *Lactobacillus* *Leuconostoc*

日本各地にその土地の気候や風土を活かした伝統発酵食品が多く存在する。富山県から石川県にまたがる平野地域は本州の中央北部に位置し、北には日本海が、南～南東側には北アルプスなど3,000m級の高い山々がせまっている。また、冬季は大変に寒い地域である。そのため四季の移り変わりは鮮明で、夏は暑く、冬は積雪があり寒さも厳しい。このような地理的特徴をもつ富山県～石川県の平野部に特産品として、伝統的発酵食品であるかぶらずしがある。かぶらずしは江戸時代に漁師の間で豊漁と安全を祈る儀式のために特別なご馳走として作られていた^{1),2)}。しかし、現在ではその作り方が各家庭で受け継がれ、自家製のかぶらずしが家庭で作られるほど一般的なものになっている。

かぶらずしは日本海で獲れた新鮮な魚(主にぶり)を塩漬にし、それをスライスした蕪(かぶら)の間に挟み込み、米麴と一緒に桶に漬け込む。これをおよそ5～14日間低温下で発酵・熟成させ¹⁾、粥状となった米麴の

米粒がついた状態で取り出しそのまま食べる (Fig.1)。かぶらずしは主に11月から1月にかけて漬け込みが行われ、多くの家庭で副食として食されている。

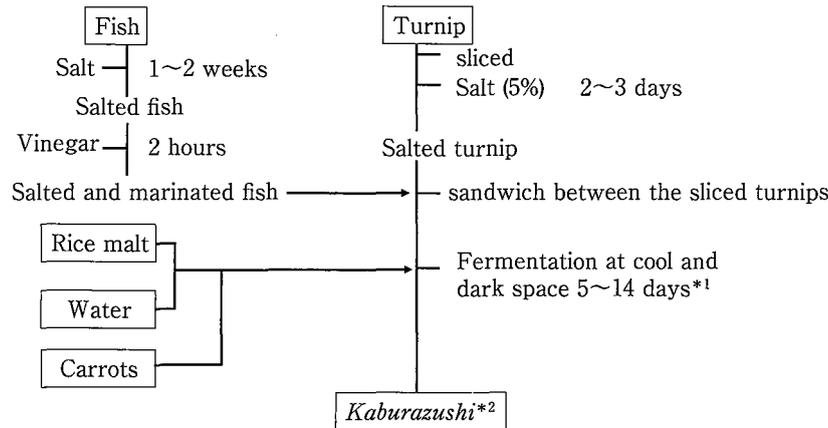
かぶらずしを作る同地域には馴れずし、さらに北の地方では様々ないずしなど魚を使った発酵食品がみられる。これらの発酵食品の多くはすでにその化学成分分析や微生物フロー解析の研究がなされ、報告されている³⁾。かぶらずしも化学成分分析や微生物フローについての研究がなされている^{4),5)}。しかし、微生物フローについては属レベルまでの同定結果が報告されているのみであり、種やその特性まで明らかにした詳細な研究はなされていない。

そこで本研究ではかぶらずしが低温で発酵されることに注目し、そこに生息する乳酸菌の同定とその特性を明らかにすることで、かぶらずしに生息する乳酸菌フローラを明らかにしたので報告する。

*¹ 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: sawa37@hotmail.com

*² 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1



* 1 Fermented samples (3 and 5 days) (products I)

* 2 Products II~V were sampled by this process.

Fig. 1 Process of manufacturing Kaburazushi

試料および実験方法

1. かぶらずしの採取

試料として用いたかぶらずしは2005年1月に富山県内にて採取した (Table 1)。生産者Aにおいて、かぶらずしの熟成段階の漬け込み液 (3日目と5日目) を、また生産者Bにおいては、様々な発酵段階のかぶらずしを採取した。また市販製品 (生産者C,D) を採取した。

2. 乳酸菌の分離

Table 1 に示した各試料は採取したその日のうちに生理食塩水によって10倍希釈を8回繰り返し、各希釈液と乳酸菌分離用MRS白亜寒天培地とで混釈法により平板培地を作成した。乳酸菌分離用MRS白亜寒天培地は、市販MRS lactobacilli培地 (OXOID社) に炭酸カルシウム (0.5%) と寒天 (1.2%) を加え、さらに好気性微生物 (カビ, 酵母, 好気性細菌など) の生育を阻止するためにアジ化ナトリウム (10 ppm) とシクロヘキシミド (10 ppm) を添加した。培養はコロニーが形成されるまで (約5日間), 25°Cで行った。炭酸カルシウムを溶かしクリアゾーンを形成したコロニーを乳酸菌とした。出現したコロニーの特徴 (コロニーの形態, 大小, クリアゾーンの大小など) を考慮し, それぞれの特徴をもったコロニーごとに3~5コロニーを釣菌し, 液体のMRS lactobacilli培地に接種した。2~3日間, 25°Cで培養した後, MRS白亜寒天平板培地に画線塗抹し, 25°Cで約5日間培養後, 出現した単コロニーを釣菌し, 乳酸菌保存用高層培地に接種し純粋分離株とした。

3. 分離株の形態的・生理的諸性質

乳酸菌として分離した株 (純粋分離株) に対して, 下記に示した形態的および生理的諸性質を調べた。方法は乳酸菌実験マニュアル⁹⁾に従った。

- ・グラム染色
- ・細胞の形態観察
- ・カタラーゼ試験

Table 1 Samples used in this study

Producer	Sample	Number of Fermentation Days
A	pickle	3
	pickle	5
B	Kaburazushi*1	8
	Kaburazushi*2	5
	Kaburazushi*1	1
	Kaburazushi*1	23
	Kaburazushi*1	1
C	Kaburazushi*2	11
D	Kaburazushi*1	15

* 1 Radish was used as a substitute for turnips

* 2 Yellowtail was used as a substitute for mackerels

- ・運動性試験
- ・グルコースからのガス発生試験
- ・生育温度試験
- ・糖類資化能試験

4. 16S rRNA遺伝子の塩基配列による簡易同定

供試菌株からDNA抽出をZHUらの方法⁷⁾に従って行い, 16S rRNA遺伝子の増幅はプライマー8 F (AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG) と15 R (AAG GAG GTG ATC CAA CCG CA) を用いてPCR反応 (94°C 30秒, 55°C 30秒, 72°C 90秒のサイクルを34回繰り返し, その後, 72°C 120秒, 4°Cで保持) を行った。得られたPCR産物をWizar SV gel and PCR clean-up system (Promega) にて精製し, Big Dye[®] Terminator v.1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応 (96°C 10秒, 50°C 5秒, 60°C 240秒のサイクルを24回繰り返し, その後, 4°Cで保持) を行った。なお, シーケンス解析は16S rRNA遺伝子の前半

約500 bpを解析対象とするためにプライマーとして8Fと520R (ACC GCG GCT GCT GGC)を用いた。16S rRNA遺伝子の増幅反応およびシーケンス反応はPCT-0200 DNA Engine (BIO-RAD社製)を用いた。シーケンス反応後、310 Genetic Analyzer (ABI PRISM™)にて塩基配列を解読した。得られた塩基配列をDDBJのFASTAにより相同性検索を行い、既存の基準株などの塩基配列との相同値が99%以上のものを同種と判断し、同定の結果とした。

結 果

1. 乳酸菌の分離

25℃にて培養をし、クリアゾーンを形成したコロニーの形態や酸生成の違い、細胞形態の特徴を観察しながら、計39株の分離菌株に絞込み、これらを本実験の供試菌株とした。

2. 分離菌株の特性

分離株に対してグラム染色、カタラーゼ試験、硝酸還元試験を行った。39株すべてにおいてグラム陽性、カタラーゼ陰性、硝酸還元反応陰性であったことから、これらすべてが乳酸菌であると判断した。また、形態観察から桿菌(17株)と球菌(22株)の存在を確認した。分離株39株中22株がグルコースからガス発生を確認した。分離株の多くが低温域(10~25℃)で生育した。また、乳酸菌としては稀な特性である4℃で生育する株も存在した。さらに、運動性を有する株(1 A-1)が1株存在した。

3. 16S rRNA遺伝子の塩基配列による簡易同定

各分離株の16S rRNA遺伝子の塩基配列のFASTAによる相同性検索の結果、分離株39株は次のように4属9種に高い相同性を示した。その結果をTable 2に示した。分離株の半数である20株が*Leuconostoc*属で、そのうち8株が*Leu. gasicomitatum*、8株が*Leu. mesenteroides*、2株が*Leu. gelidum*、また*Leu. carnosum*と*Leu. citreum*がそれぞれ1株ずつであった。*Lactobacillus*属と同定された株は15株であった。そのうち14株が*L. sakei*と高い相同性を示した。残りの1株は*L. cruvatus*と高い相同性を示し、表現性状試験で運動性が確認された株であった。*Weissella*属の2株はいずれも*W. cibaria*と同定された。*Enterococcus*属は2株が分離され、*E. faecium*と同定された。

4. 分離株の同定

表現形質(形態的・生理的諸性質)の結果(Table 2)をもとにBergey's Manual of Systematic Bacteriologyなど^{8),9)}を用いて基準株との表現性状の比較し、菌種の推定を行った。これらの結果は16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性検索による簡易同定の結果を、すべての分離株において支持するものであり、相同性検索による簡易同定の結果を各分離株の菌種名と決定した。分離株39株の同定結果をTable 2に示した。

考 察

北陸地方で生産されているかぶらずしに生息する乳酸菌について、分離・同定を行い、同時に生息する乳酸菌の特性について調査した。富山県で採取したかぶらずし試料9点から、酸生成が認められたコロニーより39株を分離した。分離菌株のすべては乳酸菌であり、4属9種に分類された。分離株のうち、属(genus)レベルで最も多かったのが*Leuconostoc*属、続いて*Lactobacillus*属であった。種(species)レベルでは*L. sakei*(14株)が最も多く、続いて*Leu. gasicomitatum*(8株)と*Leu. mesenteroides*(7株)であった。菌種として*L. sakei*と*Leu. mesenteroides*が多く分離された。これら両菌種は清酒生酏に生息し、低温生育を特徴とする乳酸菌¹⁰⁾として有名である。かぶらずしの熟成過程が低温で推移することから、生酏同様の乳酸菌が生息していたのではないかと考えられる。また分離株数としては少ないが、低温生育を特徴(1℃でも生育できるとされる)とする*Leu. gelidum*¹¹⁾(strain 10B-1, 10C-2)が分離された。このような乳酸菌が我が国の発酵食品から分離され、報告されたのは初めての事例である。

一般の乳酸菌は25℃を下回ると生育速度が遅くなる。しかし、本実験において、かぶらずしからの分離乳酸菌全て(39株)が25℃以下でも生育が良好であった。かぶらずしが冬場の寒い時期に作られることから、このような固有の乳酸菌叢が形成されたと考えられる。

一方、馴れずしの一つであるふなずしやいずしの熟成に関わる微生物についていくつか報告がある^{12)~14)}。それらによると乳酸菌として、*L. plantarum*、*L. pentoceticus*(=*L. brevis*)、*L. kefir*(=*L. kefir*)、*Streptococcus faecium*(=*Enterococcus faecium*)、*Pediococcus parvulus*などの乳酸菌が優勢であると報告されている。これらの乳酸菌はいずれも25℃以上の中温域を生育至適温度としている。ふなずしやいずしが夏場に漬け込みが行われることから、中温域を至適とする乳酸菌が優勢に生息したと考えられる。

また野菜を多く含む発酵食品には*L. plantarum*が多く分離されることはよく知られている。ふなずしなどの発酵食品からは*L. plantarum*が分離されているが、かぶらずしは野菜(蕪)の占める割合が高いにもかかわらず、*L. plantarum*は全く分離されていない。これは、かぶらずしの漬け込みが冬場の寒い時期に行われることに起因し、*L. plantarum*のような中温域を至適温度とする乳酸菌の生育は困難であったものと考えられる。

かぶらずしに生息する乳酸菌についてのこれまでの報告では、分離乳酸菌の同定は属レベルまでしか行われておらず、種レベルまで同定をした報告はなかった。本研究ではかぶらずしの発酵熟成にかかわる乳酸菌を分離し、それらの表現性状を調べるとともに、16S rRNA遺伝子の塩基配列データを参考にしながら種レベルまでの同定

を行った。さらに、分離した乳酸菌のいずれれもが低温域 (25℃以下) で生育ができることを明らかにし、かぶらずしの仕込み時期が冬の寒い時期であることから、環境に適応した乳酸菌が優勢に生息していたことも明らかにした。以上の結果より、低温域 (25℃以下) で良好に生息する乳酸菌 (*L. sakei*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. gasicomitatum*) が、かぶらずしの発酵・熟成にかかわる主要な乳酸菌であると判断した。また、本研究によって得られた結果は、かぶらずしの発酵熟成にかかわる乳酸菌の詳細を明らかにした初めての報告となる。

近年になって、かぶらずしに多く含まれるγ-アミノ酪酸 (GABA) が注目され、生息する乳酸菌によって生産されている可能性が報告されている¹⁹⁾。このようにかぶらずしそのものがもつ機能が注目され始めており、今後、生息する乳酸菌の機能性に焦点を当てた研究が盛んになることが予想され、本報告で得られた知見が広く利用されるものと考えられる。

要 約

富山県から石川県にかけての平野部には伝統的な発酵食品の一つとして日本海で捕れた魚 (主にブリ) を塩漬にし、スライスした蕪 (かぶら) の間に挟み込み、さらにそれらを米麴とともに漬け込む『かぶらずし』がある。かぶらずしは11月から翌年1月にかけての最も寒い時期に漬け込みが行われる。本研究ではかぶらずしに生息する乳酸菌の分離・同定と分離菌株の特性を明らかにすることを目的とした。富山県にて採取したかぶらずしから39株の乳酸菌を分離した。さらに分離菌株の16S rRNA遺伝子塩基配列のシーケンス解析し簡易同定を行った。分離菌株は *Lactobacillus sakei* や *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leu. mesenteroides* などの乳酸菌が主体であり、それらの多くが低温を好む低温性の乳酸菌であることを明らかにした。これはかぶらずしの漬け込みが冬であることや低温で発酵が行われるためであると考えられた。

文 献

- 1) 青木悦子：金沢・加賀・能登の伝承料理 伝統食品・食文化 in 金沢 (横山理雄・藤井建夫編) (幸書房, 東京), p.93 (1996)
- 2) 神埼一豊：かぶらずし 水産加工品総覧 (三輪勝利編) (光琳, 東京), p.416 (1983)
- 3) 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), p.121 (1992)
- 4) 久田 孝・浅井順子・横山理雄：金沢産かぶらずしの細菌フローラ, 日本食品微生物学会誌, 14, 111～114 (1997)
- 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細菌フローラ, 日本水産学会誌, 64, 1053～1059 (1998)
- 6) 岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル (小崎道雄 監修) (朝倉書店, 東京), p.164 (1992)
- 7) ZHU, H., QU, F. and ZHU, L. H. : Isolation of genomic DNAs from plants, fungi, and bacteria using benzyl chloride, *Nucleic Acids Res*, 21, 5279～5280 (1993)
- 8) Bergy's Manual of Systematic Bacteriology second edition. Vol.3 Springer (2009)
- 9) ENDO, A. and OKADA, S. : Reclassification of the genus *Leuconostoc*, and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2195～2205 (2008)
- 10) 吉澤 淑：酒の科学 (朝倉書店, 東京), p.210 (1995)
- 11) SHAW, B. G. and HARDING, C. D. : *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from Chill-Stored Meats, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 217～223 (1989)
- 12) 松下憲治：鮎酢に関する研究 (第1報), 日本農芸化学会誌, 13, 629～634 (1937)
- 13) 松下憲治：鮎酢に関する研究 (第2報), 日本農芸化学会誌, 13, 635～638 (1937)
- 14) 吉澤淑ら：醸造・発酵食品の辞典 (朝倉書店, 東京), p.585 (2002)
- 15) 会田久仁子・角野 猛：かぶらずしおよび大根ずしの諸成分と微生物について, 日本食生活学会誌, 18, 145～152 (2007)

(平成21年11月30日受付, 平成22年2月10日受理)