

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05828

研究課題名(和文)最先端分析技術を用いたイカ塩辛の発酵機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the mechanisms involved in fermentation of salted squid by using advanced analytical procedures.

研究代表者

水澤 奈々美(川口奈々美)(Mizusawa, Nanami)

北里大学・海洋生命科学部・特任助教

研究者番号：70813757

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、我が国における伝統的な水産発酵食品の一つであるイカ塩辛の発酵機構の解明を最新の分析機器を用いて試みた。異なる塩分と温度で製造したイカ塩辛を分析して比較したところ、低塩分低温貯蔵塩辛では細菌叢および代謝産物の変化はほとんど認められなかったのに対し、高塩分常温熟成塩辛ではStaphylococcusの割合が増加するなど細菌叢が大きく変化し、遊離アミノ酸や有機酸の含量も増加した。また、市販のイカ塩辛製品についても代謝産物の解析を行い官能検査と比較したところ、遊離アミノ酸が呈味に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我が国の伝統的な水産発酵食品であるイカ塩辛について、次世代シーケンサーや最新の機器分析を用いた細菌叢や代謝産物の網羅的解析と官能検査を組み合わせ、発酵機構の解明と塩辛製品の品質評価を試みた。本研究により、難培養性細菌の動態を含めた塩辛中の細菌叢の発酵中に生じる変化および呈味に関わる代謝産物の変化が明らかとなった。また、これらの網羅的解析と官能検査を組み合わせることで、発酵中に生じる種々の変化要因を捉えることが可能となった。本研究により得られた技術を応用することで、水産発酵食品の新たな品質管理が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文):Squid shiokara is one of the typical, traditional fermentation seafoods in Japan. During this fermentation, bacteria existing on squid skin are considered to contribute to the development of shiokara flavor and taste, together with endogenous enzymes of squid. In this study, we employed a combination of 16S rDNA metagenomic and metabolomic analysis to comprehensively understand this fermentation process. Low-salted shiokara showed almost no changes in the bacterial community and the content of metabolites. In contrast, high-salted shiokara exhibited the bacterial community significantly different from that before processing with the increased rate of Staphylococcus and the increased content of free amino acids and organic acids. In addition, metagenomic and metabolomic analyses were performed for the commercially available squid shiokara products together with sensory test, suggesting that free amino acids are important for their taste development.

研究分野：水圏微生物学

キーワード：水産発酵食品 メタゲノム解析 メタボローム解析 官能検査 イカ塩辛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国には発酵を利用した独自の伝統的な水産加工食品が多く存在するが、これらはユネスコ無形文化遺産に登録された和食を特徴づける一つとなっている。塩辛は代表的な水産発酵食品の一つであり、魚介類の筋肉や内臓などに食塩を加えることにより、腐敗を防ぎながら旨味を醸成させたものである。このような水産発酵食品においては、原料に内在する消化酵素に加えて、外来性の微生物に由来する代謝酵素の役割も重要であるとされる。しかし、塩辛の作製において、熟成の制御は経験豊富な職人の技に依存し、品質が安定しないという欠点がある。

一方、近年の健康志向で塩辛も減塩化が進んでいる。従来の伝統的なイカ塩辛の製造では、10%程度の食塩を加えて常温で熟成を進めてきたが、近年の減塩塩辛では5%程度の食塩を用いており、腐敗を防ぐために10以下の低温で製造および流通されている。このような減塩、低温貯蔵塩辛は、熟成が進行しないため、従来の伝統的なイカ塩辛と比べて風味に欠くとされるが、品質的にどのような違いがあるのかは明確でない。

塩辛の品質には微生物による発酵が重要であることから、これまでも塩辛を対象として、培地培養を用いた微生物研究は多数行われてきた。これらの研究は、培養可能な微生物と既知の呈味成分および香気成分が対象であった。近年、環境中の微生物のほとんどは培地培養できない難培養性細菌であることが明らかとなっている。イカ塩辛のような水産発酵食品において、このような難培養性細菌を含めた微生物叢の熟成に果たす役割は明らかではない。

2. 研究の目的

一般に、発酵食品においてその風味を決定するのは微生物の代謝産物であることから、本研究では、異なる製造条件で作製されたイカ塩辛において代謝産物および微生物叢の網羅的解析を行い、官能検査も加えることで、これまでに不明であった良質なイカ塩辛を特徴付ける鍵微生物および鍵代謝産物の同定を試みる。

本研究では、(1)異なる製造方法で作製されたイカ塩辛、すなわち高塩分の伝統的なイカ塩辛と低塩分、低温貯蔵イカ塩辛(低温貯蔵イカ塩辛)を対象とし、熟成中における微生物叢の変化を解析するとともに、遊離アミノ酸や有機酸などの代謝産物の変化を解析すること、および(2)市販の様々なイカ塩辛製品を用いて細菌叢および遊離アミノ酸および有機酸の分析を行い、官能検査と組み合わせることにより、異なる製造方法により作製されたイカ塩辛製品の特徴を明らかにし、その呈味に重要な役割を果たす微生物および代謝産物を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)異なる製造方法で作製されたイカ塩辛における微生物叢と代謝産物の変化

3-(1)- イカ塩辛の作製

市販の冷凍スルメイカを使用し、低温貯蔵イカ塩辛ではイカ肉に5%、肝臓に7%の食塩を加え、また、伝統的なイカ塩辛ではイカ肉に12%、肝臓に7%の食塩を加え、5で4日間貯蔵した。イカ肉は塩漬け後に細切りにし、肝臓は細切して混合した。次に、低温貯蔵イカ塩辛は調味料を加えて5で7日間、伝統的イカ塩辛は糀を加えて25で4日間貯蔵した。この間、低温貯蔵イカ塩辛では貯蔵0、2、4、6、7日目に、また伝統的なイカ塩辛では0、2、4日目に分析試料を採取した。データの再現性を確認するため、塩辛の作製は3回行った。

3-(1)- メタゲノム解析による細菌叢解析

各イカ塩辛液状部0.2gより、Cetyl trimethyl ammonium bromide法によりDNA抽出を行った。得られたDNA溶液を鋳型として、MiSeq解析用のオーバーハング配列を付加した16S rDNAのV1-V3領域を増幅するプライマーペアを用いてPCRを行ない、Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA)を用いてindexを付加したライブラリーを作製した。これらのライブラリーにつき、MiSeq Reagent Kit v3 (600サイクル)を用いてMiSeq (Illumina)にてシーケンスを行った。

3-(1)- 遊離アミノ酸分析

各イカ塩辛液状部を0.5g採取し、2% 5-スルホサリチル酸を加えて遊離アミノ酸を抽出した。次に、抽出したアミノ酸を0-フタル酸アルデヒド、-メルカプトプロピオン酸およびメタノールを用いて蛍光誘導体化した。アミノ酸分析には逆相クロマトグラフィーカラム(TSK gel ODS-80Ts, 東京, 東ソー)を装着した高速液体クロマトグラフ(HPLC)(JASCO co-2065Plus, 東京, 日本分光)を用いた。なお、アミノ酸分析の標準液には、21種類のアミノ酸およびタウリンを混合して用いた。

3-(1)- キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析装置(CE-TOF-MS)によるメタボローム解析
HPLC を用いて 3-(1)- と同様の方法にて遊離アミノ酸の測定を行なった。また、CE-TOF-MS によるメタボローム解析についても行なった。すなわち、イカ塩辛試料の 50%アセトニトリル水溶液(v/v)(内部標準物質濃度:40 μM)を加え、冷却下にて破砕機を用いて破砕(1,500 rpm, 120 秒 × 2 回)し、さらに同量の 50%アセトニトリル水溶液(v/v)を加えた。組織破砕後、遠心分離(2,300 × g, 4, 5 分)を行った。遠心分離後、上層につき限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び 50 μL の Milli-Q 水に溶解して、Agilent CE-TOF-MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)での測定に供した。

(2) 市販の様々なイカ塩辛製品の品質の特徴

イカ塩辛の品質評価系を確立するため、市販のイカ塩辛製品を対象としてメタゲノム解析およびメタボローム解析を行った。様々なイカ塩辛製品を用いて細菌叢および遊離アミノ酸および有機酸の分析を行い、官能検査と組み合わせることにより、異なる製造方法により作製されたイカ塩辛製品の特徴を明らかにすることを試みた。

3-(2)- 市販のイカ塩辛製品

検査試料は市販の 13 種類の各種イカ塩辛製品を全国各地からインターネットで通信販売を利用して購入し用いた。

3-(2)- 細菌叢解析

3-(1)- と同様に行なった。

3-(2)- 遊離アミノ酸分析

3-(1)- と同様に行なった。

3-(2)- 有機酸分析

イカ塩辛製品の液状部 0.1 g に 0.1 M HCl を 500 μl 加え混合し、再度 0.1 M HCl を 500 μl 加えた。15 分間室温で静置した後、15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 200 μl 採取後、同量のヘキサンを加えて混合した。15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、下層 200 μl 採取し、3 倍量のアセトニトリルを加えて混合し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。得られた上清 200 μl を蒸留水で 5 倍希釈し、分析に用いた。なお、有機酸標準液は、乳酸、酢酸、オキサロ酢酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、プロピオン酸、ケトグルタル酸、ピログルタミン酸を超純水で希釈し、各 100 μM となるように混合した。有機酸は液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF-MS) (AB Sciex, Foster City, CA)を用いて定量した。

3-(2)- 官能検査

官能検査パネルの選定

官能検査のパネルを選定するため、基本となる 5 味(甘味、塩味、酸味、苦味および旨味)の識別試験を行った。5 味を代表する呈味物質として、ショ糖 0.4%、食塩 0.13%、酒石酸 0.005%、カフェイン 0.025%およびグルタミン酸ナトリウム 0.05%を調製した 5 種の標準液と、蒸留水(無味)を試験液とした。5 味の識別試験に合格した 20 歳代の男女計 15 名を以降の官能検査のパネルリストとして用いた。

市販イカ塩辛製品の官能検査

甘味、塩味、旨味およびこく味の 4 項目において、10 段階(0-10)評価の分析型官能検査を行った。また、検査方法には、1 回の試食で比較する試料数が少なく、全ての試料を平等に検査できるとされる、つり合い不完備型計画を用いた。

4. 研究成果

(1)異なる製造方法で作製されたイカ塩辛における細菌叢と代謝産物の変化

減塩、低温貯蔵イカ塩辛の細菌叢の属レベルの解析では、原料イカ肉および貯蔵段階の各試料で *Vibrio* 属細菌が優占し、組成比の製造日やロット間の違いは小さかった。なお、原料の塩漬イカ肉では *Psychrobacter* 属細菌もかなりの割合で検出されたが、製造過程の試料では減少した。次に、3 つのロットに分けて貯蔵日数を 14 日に伸ばしたが、いずれのロットとも *Vibrio* 属が優占したままで、細菌叢の変化はほとんど認められなかった。また、仕込み時からの細菌叢の変化が小さいことから、細菌は増殖していないことが示唆された。一方、伝統的イカ塩辛については、作製回ごとに塩漬イカ肉および製造過程の試料で細菌叢が異なったが、いずれの試料でも熟成が進むにつれて *Staphylococcus* 属の割合が増大する傾向が認められた。貯蔵日数を 14 日に伸ばしたところ、7 日以降 *Staphylococcus* 属の割合が 90%以上を占めた。

遊離アミノ酸分析では、低温貯蔵のイカ塩辛の液状部では、タウリンおよびリシンが多く認め

られたが、遊離アミノ酸およびタウリンの総量は、製造最終日の7日目でも1,783 mg/100 gと、貯蔵0日目の1,863 mg/100gに比べて大きな差はなかった。一方、伝統的イカ塩辛の液状部では、遊離アミノ酸量およびタウリン量とも製造工程中に大きく変化し、その総量は、0日目の2,467 mg/100 gから4日目の6,527 mg/100gへと大きく増加した。

CE-TOF-MSを用いたメタボローム解析を行なった。その結果、塩辛試料より178のピーク(カチオンモード111, アニオンモード67)について候補化合物が付与された。低温貯蔵塩辛および伝統的塩辛について、保蔵開始時および保蔵終了時の試料を解析したところ、低温貯蔵塩辛と比べて、伝統的塩辛では呈味や香気に関係するアミノ酸に加え、乳酸、リンゴ酸およびコハク酸などの有機酸で熟成に伴った増加が認められた。

(2) 市販の様々なイカ塩辛製品の品質の特徴

各製品は属レベルの細菌叢解析で大きく異なり、*Vibrio*属、*Staphylococcus*属、*Acinetobacter*属、*Mycoplasma*属が優占するグループに分けられた(図1)。このように、現在流通している塩辛ではProteobacteria門細菌が優占する製品が多く、製品ごとに細菌叢が大きく異なった。原料イカ肉付着細菌、食塩濃度、製造場所および製造温度の違いがイカ塩辛中の細菌叢に影響を及ぼすものと考えられた。

遊離アミノ酸分析では、製品ごとに特徴がみられた。アミノ酸や調味液が添加された製品ではグルタミン酸などのアミノ酸が多く検出された。

各市販イカ塩辛中のLC-QTOF-MSによる有機酸の分析では、乳酸、酢酸およびオキサロ酢酸は定量できなかったことから、分析方法を検討する必要があると考えられた。また、クエン酸はどの試料においても低濃度であった。一方、いずれの試料においてもピログルタミン酸量は多かった。特にこの有機酸の含量が顕著に高かった製品では、調味料が添加されていたことから調味料の影響が考えられた。

細菌叢と代謝産物の関係をnMDS解析で調べた。*Vibrio*属が多く認められた製品DおよびGはnMDS解析結果のx軸の正方向にプロットされた。また、測定した遊離アミノ酸のリシン、ヒスチジン、トリプトファンおよびアルギニンもx軸の正方向と相関関係にある。以上のことから、*Vibrio*属が多い製品ではリシン、ヒスチジン、トリプトファン、アルギニンが多いことが明らかになった。低温製造イカ塩辛において*Vibrio*属が多かったことから、これらのアミノ酸は調味料として添加されている可能性が示唆された。

また、nMDSによる官能検査結果では、減塩貯蔵製品およびアミノ酸添加製品がそれぞれ近くに配置された。さらに、この官能検査結果と、各イカ塩辛製品の塩分、有機酸および遊離アミノ酸の濃度との相関関係を解析したところ、グリシン、アルギニン、チロシン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシンおよびリジンの間に相関関係が認められた。また、アミノ酸無添加製品間において官能検査結果のnMDSを作成したところ、伝統的塩辛と低温貯蔵塩辛がそれぞれ近くなるよう配置された(図2)。このnMDSと、塩分、有機酸および遊離アミノ酸を比較したところ、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、アラニン、チロシン、バリン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、リシン濃度および塩分について、官能検査結果との相関関係が認められた。これらのことから、上記のアミノ酸は、アミノ酸無添加製品間における官能検査結果を分けた一要因と考えられた。

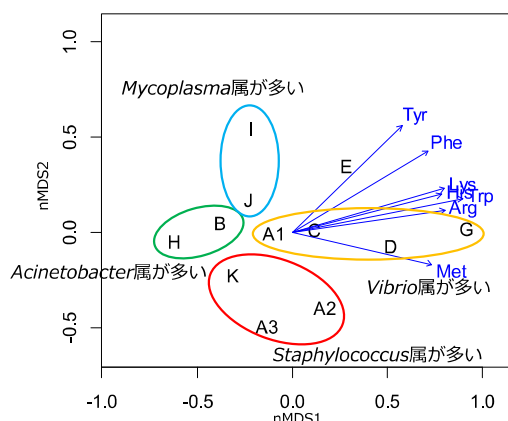


図1. nMDS解析による細菌叢と代謝産物量の関係。nMDS解析により、細菌叢および代謝産物との相関を二次元解析し、青い矢印で表わした。

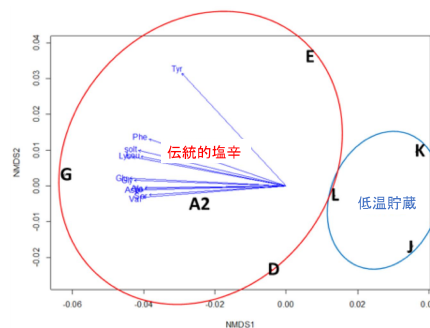


図2. アミノ酸無添加製品間でのnMDS解析による官能検査結果と代謝産物量の関係。nMDS解析により、細菌叢および代謝産物との相関を二次元解析し、青い矢印で表わした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nanami Mizusawa, Daisuke Ouchi, Kanta Nishimura, Toshio Ito, Atsuko Nagaoka, Nobuhiko Ueki, Yoko Matsuoka, Jianrong Wan, Takehiko Yokoyama and Shugo Watabe
2. 発表標題 Metagenomic and metabolomic analyses of squid shiokara, a typical and traditional fermentation seafood in Japan
3. 学会等名 International Symposium on Aquatic Metagenomics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内大輔・水澤奈々美・渡邊雄樹・高橋良広・安元剛・神保充・長岡敦子・植木暢彦・松岡洋子・万建栄・渡部終五
2. 発表標題 塩辛原料スルメイカの付着細菌叢解析および塩辛製品細菌叢解析の再現性
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内大輔・水澤奈々美・西村勘太・高橋良広・安元剛・神保充・渡部終五
2. 発表標題 市販イカ塩辛液状部の細菌叢解析および塩蔵処理による原料イカ肉付着細菌叢の変化
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡部 終五 (Watabe Shugo) (40111489)	北里大学・海洋生命科学部・特任教授 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------