

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870788

研究課題名(和文)水産発酵食品における複合バイオフィルムの機能解明と応用化

研究課題名(英文)Functional analysis of biofilm community in fish sauce and application of biofilm

研究代表者

成澤 直規(NARISAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：90632034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：魚醤の発酵・熟成は原料由来の自己消化酵素に加え、微生物の存在も影響すると考えられる。本研究では微生物のバイオフィルム形成に着目し、発酵メカニズムの解明と応用化を目的とした。当研究室にてニジマス为原料とする魚醤のもろみ画分より複数の耐塩性バイオフィルム形成細菌が得られ、いずれもStaphylococcus属細菌であった。分離細菌には高いプロテアーゼ生産能を有するものも存在した。もろみよりDNAを抽出し、16S rRNAを対象としたクローン解析の結果、本細菌が優占種として検出された。本細菌を担体等に付着させ、発酵槽に導入することで高い発酵能を得られるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Fish sauce is a liquid extracted from the fermentation of fish with salt. Salt-tolerant bacteria-derived protease may contribute to fermentation of fish sauce. In this study, we investigated biofilm and its function in fish sauce. Fish sauce was prepared by mixing *Oncorhynchus mykiss* and sterile distilled water with salt. The sample was kept at 37 °C under static condition for 3 months. Modified marine medium was used to isolate bacteria and investigate biofilm mass. We isolated biofilm-forming bacteria from fish sauce mash, and this strain possessed high protease productivity. Results of 16S rRNA gene sequence analysis showed high homology to *Streptococcus* sp.. Microflora analysis of the fish sauce mash by 16S rRNA clone analysis revealed *Streptococcus* sp. was dominant species until 3 months after fermentation. Induction of the biofilm into fermentation bath will be of use for an acceleration of fermentation process.

研究分野：食品微生物

キーワード：魚醤 微生物 バイオフィルム

1. 研究開始当初の背景

魚醤とは魚介類を原材料とした発酵液体調味料であり、グルタミン酸等のうまみ成分が豊富に含まれ、独特の風味を持つ。製造は、概ね原料となる魚介類に腐敗防止のために多量の塩を加え(20%程度)、発酵・熟成を経て作られる。しかし発酵期間は半年から1年ほどの長期にわたり、腐敗菌やカビ臭の原因となる産膜酵母、ヒスタミン生産菌への対策など製造レベルでの課題が多く存在する。さらに、減塩化や魚臭の低減なども解決しなければならない課題である。魚醤は他の発酵食品と比べ科学的根拠に基づく解析が立ち遅れており、これら製造課題に対して未だ有効な対処法は確立されていない。

従来より魚醤の発酵・熟成では高塩分条件で行われるため微生物の関与は乏しく、主に原料由来のプロテアーゼによって進行するものと考えられてきた。近年、東南アジア産の魚醤から耐塩性プロテアーゼ生産菌が分離・同定されている(Noguchi et al., Food Preser. Sci., 2009 など)。発酵期間中の微生物の変遷についても明らかになりつつある(Yoshikawa et al., Food Microbiol., 2010 など)。これら事実は魚醤発酵における微生物の関与を強く示唆するものである。

ところでバイオフィームとは、『界面に形成される微生物のフィルム状構造体』であり、構成種は菌体外成分に覆われ密集した状態で存在している。バイオフィームの形成は微生物の環境応答やストレスに対する耐性化の1つ手段であると考えられている。バイオフィーム内部では菌体が高濃度に保持されており、微生物間でよりスムーズな代謝物のやり取りが可能となり、現在では排水処理システム等に広く活用されている。食品発酵の製造にも経験的にバイオフィームを利用しているものと推察される。たとえば発酵の多くは『もろみ』状態から始められるが、もろみは固形分を多く含むためにこれを足場としてバイオフィームが形成され、安定的な発酵に寄与していると考えられる。また、食酢醸造では液体-気体界面に菌膜が形成されるが、これもバイオフィームの1例であり発酵にとってなくてはならないものである。一方で、魚醤発酵と細菌バイオフィームを関連付けた研究はこれまでのところ報告されていない。

2. 研究の目的

これまでに当研究室ではニジマス为原料とした魚醤の創成に取り組み、成分的な特徴付けについて解析を行ってきた。さらに部分的ではあるが、発酵過程にお

ける微生物の変遷についても解析を行っている。そこで本研究では魚醤中の微生物の挙動をバイオフィーム形成という視点で評価することを目的とする。また、これらバイオフィームの存在が魚醤発酵へどのような影響を及ぼすのか理解することを目的として、細菌の特徴づけを行うこととする。これら研究を通じ、バイオフィームを利用した魚醤の速醸化などを旨とした基盤を形成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 魚醤

原料として静岡県富士宮市にて養殖されたニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の鮮魚を使用した。仕込みはニジマス 500 g に対し蒸留水を 250 ml 加えた。食塩は 20% となるよう調製した。37 °C にて 90 日間発酵を行った。

(2) 分離・培養

Marine 培地 (BD 社製) を基本とし、異なる塩分濃度のものを複数種用いた。魚醤もろみを適宜段階希釈し、寒天平板培地へ塗布した。培養は 37 °C、5 日間とした。必要に応じて好気、および 5% CO₂ 条件にて培養を行った。得られたコロニーを鈎菌し、単一コロニーが得られるまで純化作業を繰り返した。

(3) バイオフィーム形成能評価

バイオフィーム形成用培地は分離培養と同様のものを使用した。96 well microtiter plate 1 well あたり培地 190 μl に対して菌液を 10 μl 加え、20 時間培養を行った。培養後、培養液の除去、well の洗浄を行った後、サフラニン溶液で染色した。被色細胞から 70% EtOH で色素抽出を行い、492 nm での吸光度値によりバイオフィーム量を評価した。

(4) プロテアーゼ活性評価

スキムミルク入り寒天培地上にディスクを置き、これに各種菌培養液を 10 μl 滴下し、20 時間 37 °C にて培養を行った。培養後のスキムミルク分解に伴う透明帯の長さを測定することでプロテアーゼを評価した。

(5) シーケンスによる菌種の同定

バクテリアより DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。Big dye 反応後の精製物をシーケンス解析に供した。得られた塩基配列情報を Blast 解析に供し、相同性検索を行った。

(6) 菌叢解析

魚醤より Total DNA を抽出後、16S rRNA

遺伝子 V7-V10 領域の増幅を行った。クローニング後、シーケンス解析に供した。各魚醬サンプル毎に少なくとも 50 クローンのシーケンスを行い、細菌叢解析とした。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成細菌のスクリーニング

バイオフィーム形成細菌のための分離源として、当研究室で作製した養殖されたニジマスの鮮魚を原料とした魚醬のもろみを使用した。これまでにニジマス魚醬の遊離アミノ酸や pH、分解速度など基本パラメーターについて経時的に調査してきた。その結果、概ね 1 ヶ月以降に各種パラメーターが安定することを明らかにしている。そこで分離培養は発酵途中である 15 日目、安定期である 30 日目と 90 日目のもろみ成分の計 3 サンプルを利用した。培養には Marine 培地 (BD 社製) を基本とし、異なる塩分濃度のものを複数種用いた。発酵 15 日目のもろみにおいて最も多くの細菌種が得られ、発酵日数の延長に従い得られる生菌は著しく低下した。また、いずれの発酵日数においても 5% 塩添加培地で多くの細菌が得られ、10% 以上の塩条件下では生菌は得られなかった。約 1,000 株ほどのバクテリアを分離・培養し、これと同条件下でのバイオフィーム形成量を評価した結果、100 株程度が高いバイオフィーム形成能を示した。これら細菌種より DNA を抽出し、16S rRNA を対象とした塩基配列解析に供したところ、いずれの株も *Staphylococcus* 属細菌と高い相同性が得られた。これら分離菌について、無菌的に調製した魚醬成分を含む培地中で増殖が促進され、またバイオフィーム形成能も増加した。本現象は塩の影響ではないことを確認している。

(2) もろみ中におけるバイオフィーム形成菌の挙動

これまでにニジマス魚醬の細菌叢について、16S rRNA クローン解析により経時的に解析を行っており、本申請における研究により一部を補足し、詳細な解析を行った。その結果、もろみ中では発酵初期から 3 ヶ月にわたり *Staphylococcus* 属細菌が優占化することが明らかとなった。

本菌の由来を調べるため、ニジマスの内臓や配合飼料、水環境等の試料を対象としてクローン解析を行った結果、ニジマス内臓の試料中に *Staphylococcus* 属細菌が存在することが明らかとなった。よって、本菌は原料となるニジマスに由来するものと推察された。

(3) バイオフィーム形成細菌の特徴づけ
一般的に魚醬の発酵には原料の内臓部位に含まれる自己消化酵素が主要な役割を担うものと考えられてきた。一方でこれまでの当研究室での解析結果から、原料の内臓(胃、幽門垂、脾臓、腸)のプロテアーゼは 10% 以上の塩存在下では著しく活性が低下することを明らかにしている。このことから、魚醬の発酵には内臓由来のプロテアーゼだけではなく、微生物由来のプロテアーゼの寄与も大きいものと考えられた。そこで、高いバイオフィーム形成能を有した複数の *Staphylococcus* 属細菌を対象として、塩非存在下でプロテアーゼ生産性を指標としたスクリーニングを行った結果、複数の株で非常に高いプロテアーゼ活性を有するものが得られた。これら細菌種は 10% 塩存在下においても十分な増殖が認められ、また同時にプロテアーゼ活性も有することが確認された。

考察・まとめ

本研究では魚醬のもろみより高いバイオフィーム形成能を有する *Staphylococcus* 属細菌を分離・同定した。本菌は魚醬のもろみ中で 3 か月間にわたり優占していることが明らかとなった。*Staphylococcus* 属細菌は魚醬やなれずしなど異なる原料による水産発酵食品中で見出されている。これまでに *Staphylococcus* 属細菌は香気成分の形成に関与すると考えられているが、詳細については明らかとなっていない。本研究で得られた *Staphylococcus* 属細菌は高塩環境下で高いプロテアーゼ活性を有することが明らかとなった。よって、魚醬中においてタンパク質分解とそれに付随したアミノ酸の生成に関与するものと推察された。一方で、分離された *Staphylococcus* 属のプロテアーゼ生産性には株間で大きな違いがみられ、プロテアーゼ生産性を示さないものも存在下した。これら細菌種の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列はほぼ一致している。これらの結果は、遺伝子レベルでの種の同定だけではなく、分離培養の必要性を示唆するものであり、同時に多様な細菌が魚醬内で様々な役割を担っているものと推察される。

16S rRNA 遺伝子を対象とした魚醬のもろみ成分の細菌叢解析を経時的に追跡した結果、乳酸菌が優占化し、さらに幅広い細菌種の消長が明らかとなった。一方で分離培養により得られた細菌種は *Staphylococcus* 属細菌や *Bacillus* 属細菌など限定的なものであった。より広範囲な細菌種を分離するためには、分離培養法などの工夫が必要であると考えられる。

本研究で得られた *Staphylococcus* 属細菌の培養は、培地中に魚醤成分を加えることで増殖が促進し、それに伴いバイオフィーム形成量も増加した。このことは魚醤もろみ中で強固なバイオフィームを形成していることを裏付けるものである。魚醤成分に含まれる細菌増殖因子を利用し、またバイオフィームというより実環境を模した培養条件を構築・応用利用することで幅広い細菌種が得られるものと期待される。

魚醤中に含まれる細菌種間相互作用を解析するために、分離された細菌を2種共培養条件下でのバイオフィーム形成を評価したが、現在までのところポジティブな関係性は見出されていない。今後、様々な細菌を用いて相互作用を明らかにすることで安定的かつ高機能性を有するバイオフィームの構築が可能となり、これを用いた速醸化や香気成分の改変など応用利用することが可能になるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

日本食品科学工学会 平成27年度関東支部会 東京海洋大学 (2015年3月14日)

『ニジマス魚醤発酵における微生物の役割に関する検討』

渡邊真衣, 成澤直規, 鳥居恭好, 竹永章生

日本食品科学工学会 第60回記念大会 実践女子大学 (2013年8月29日~8月31日)

『魚醤発酵における微生物の影響に関する検討』

成澤直規, 加藤達人, 大沼勇斗, 阿部申, 鳥居恭好, 竹永章生

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成澤 直規 (NARISAWA, Naoki)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：90632034

(2) 研究協力者

竹永 章生 (TAKENAGA, Fumio)

鳥居 恭好 (TORII, Yasuyoshi)

阿部 申 (ABE, Shin)

渡邊 真衣 (WATANABE, Mai)