

## 身欠きニシンの風味向上を可能とするスターター菌株の取得

中川良二, 菅原玲<sup>1</sup>

### Isolation of a Strain as a Starter Culture to Improve the Flavor and Taste of Dried Herring “Migaki-Nishin”

Ryoji Nakagawa and Akira Sugawara<sup>1</sup>

A *Staphylococcus* strain was selected for the purpose of improving flavor and taste from the manufactured soft-dried herring “Migaki-Nishin,” and was identified as *S. saprophyticus*, the predominant species in Migaki-Nishin, via the API Staph method (Biomérieux). Subsequently, the applicability of the strain as a starter culture was evaluated by trial production of Migaki-Nishin. *S. saprophyticus* proliferated significantly in the starter inoculation group compared to that in the non-inoculated group. Moreover, the amounts of acetic acid and free amino acids related to flavor and taste improvement were increased in the starter inoculation group. These results suggest that *Staphylococcus* starter culture proliferates predominantly and may improve the flavor and taste of Migaki-Nishin.

**KEY-WORDS** : Drying herring, *Staphylococcus* bacteria, Starter, Flavor and taste

**キーワード** : 身欠きニシン, *Staphylococcus* 属細菌, スターター, 風味

身欠きニシンは漬物やそばの具材などに利用される伝統的な加工食品であり、北海道の日本海地域が主要な生産地である。製品には古くから作られている長期乾燥させた本乾, 身が軟らかい2~5日間乾燥させた八分乾, 生魚に近いソフトの3種類があり、近年は本乾の消費量が減り、調理し易い八分乾やソフトが主流になっている。

身欠きニシンを含む伝統的な水産乾物では加熱殺菌や塩蔵などの工程がないため、腐敗していないにもかかわらず細菌数の多いことが知られているが、これら細菌の動態や機能に関してはほとんど明らかにされていない。ヨーロッパなどでつくられる伝統的な発酵ソーセージ類は乾燥室で長期熟成されるが、この過程で *Staphylococcus* 属細菌などが繁殖し、独特の味わいをもつ製品になることが明らかとなり<sup>1) 2)</sup>、これらの細菌

をスターターとして利用するなどの製法が示されている<sup>3) 4)</sup>。

我々は以前の研究で、細菌数の最も多い八分乾身欠きニシンにおける製造工程中の細菌数および主要細菌種の変化を明らかにするとともに、旨味などに関係するアミノ酸や有機酸量の変化について調べ、身欠きニシン製造における細菌の関与について検討した。その結果、高品質の身欠きニシンからは *Staphylococcus* 属細菌が最優勢細菌として検出され、これら細菌種が身欠きニシンの風味や品質向上に関与している可能性が示唆された<sup>5)</sup>。

そこで、本研究ではメーカー製造の身欠きニシンから風味向上を目的に *Staphylococcus* 属細菌を選抜し、当該菌株をスターターとした身欠きニシンの試作によりスターターとしての有効性を検討した。

<sup>1</sup>中央水産試験場

事業名：経常研究

課題名：身欠きニシンの品質向上技術の開発

## 1. 実験方法

### (1) *Staphylococcus*属細菌の分離

北海道の余市町および岩内町の加工場（8カ所）から提供された八分乾身欠きニシンを試料に、マンニット食塩寒天培地（日水製薬）にて増殖したコロニーを分離源とした。培地表面上から無作為にコロニーを釣菌し、既報<sup>6)</sup>に従ってDNAを抽出した。これを鋳型にMorot-Bizotらによって報告されたMultiplex PCR<sup>7)</sup>によって、*Staphylococcus*属細菌特異的バンド（370bp）から*Staphylococcus*属細菌を選別した。

更に、*Staphylococcus*属細菌と推定されたコロニーはAPI Staph（Biomerieux）を用い、菌種を同定した。

### (2) *Staphylococcus*属細菌の培養および保存

*Staphylococcus*属細菌はトリプティックソイブロス（Becton, Dickinson and Company）を用い、30°Cで24時間振盪培養した。滅菌グリセロールにグリセロール濃度が約25%になるように培養液を混合し、凍結保存用チューブに分注して-85°Cで保存した。

### (3) 菌株の選抜

*Staphylococcus*属細菌は主に酢酸を産生する酸生成菌である<sup>8) 9)</sup>。また、八分乾身欠きニシンに対する風味への関与を調べるには乾燥工程期間内での増殖および他の細菌の影響を排除する必要がある。そこで、生ニシンをミンチ状に切断し、加熱殺菌処理したものを用い、これに*Staphylococcus*属細菌分離株の懸濁液（ $1 \times 10^7$  CFU/mL）をそれぞれ接種し、加工場での乾燥温度に近い20°Cで48時間の発酵処理を行った。得られた発酵物について、pHメーター（HM-50G, 東亜DKK）を用いてpHを測定し、pH低下を指標にスターター菌株を選抜した。

### (4) 身欠きニシンの試作

試作は基本的に加工場での製法に準じて行った<sup>1)</sup>。すなわち、原料ニシン（小樽産）の内蔵を除去し、流水で洗浄後、*Staphylococcus*属細菌懸濁液（約 $1 \times 10^7$  CFU/mL）に10分間浸して表面付着処理し、恒温恒湿機にて5日間（温度17°C、湿度40%）の乾燥処理という手順である。

### (5) *Staphylococcus*属生菌数の測定

試料は10%乳剤を調製し、マンニット食塩寒天培地を用いて塗抹法にて培養（30°C、48時間）した。培地表面上に生育した全コロニー数を計測し、*Staphylococcus*属細菌数とした。

### (6) 酢酸および遊離アミノ酸の測定

身欠きニシン中心部の幅3 cmほどを横断して採取

し、それを細かく刻んだものを試料とした。酢酸は試料に蒸留水を加え抽出処理（60分間）し、0.45  $\mu$ mのフィルターを用いてろ過後、HPLC有機酸分析システム（Prominence型、島津製作所）を用いて測定した。遊離アミノ酸は試料を6%過塩素酸で抽出処理（60秒間）し、水酸化カリウムで中和した溶液を、終濃度0.01N塩酸溶液として0.45  $\mu$ mのフィルターを用いてろ過後、アミノ酸自動分析計（L-8900型、日立ハイテクノロジーズ）を用い、蛋白質加水分解物分析法に準じて測定した。

## 2. 実験結果

### (1) *Staphylococcus*属細菌の分離および選抜

8カ所の加工場から提供された八分乾身欠きニシンを試料として、マンニット食塩寒天培地にて増殖したコロニー（全22コロニー）についてMultiplex PCR<sup>7)</sup>を行ったところ、17コロニーから*Staphylococcus*属細菌を示す370bpのバンドが検出された。*Staphylococcus*属細菌と推定されたコロニーはAPI Staphを用いて菌種を同定した（表1）。その結果、*S. saprophyticus*が7株、*S. sciuri*および*S. lentus*が各3株、*S. xylosus*が2株、*S. cohnii*および*S. hominis*が各1株であった。

表1 メーカー製造の八分乾身欠きニシンから分離した*Staphylococcus*属細菌

菌株番号	分離加工場	アピスタフによる菌種同定
1	A	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
2		<i>Staphylococcus sciuri</i>
3	B	<i>Staphylococcus sciuri</i>
4	C	<i>Staphylococcus cohnii</i>
5		<i>Staphylococcus xylosus</i>
6	D	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
7	E	<i>Staphylococcus lentus</i>
8		<i>Staphylococcus lentus</i>
9		<i>Staphylococcus xylosus</i>
10		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
11	F	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
12		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
13		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
14	G	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
15		<i>Staphylococcus sciuri</i>
16	H	<i>Staphylococcus hominis</i>
17		<i>Staphylococcus lentus</i>

スターター菌株の選抜のため、加熱殺菌処理したミンチ状ニシンに*Staphylococcus*属細菌分離株（17菌株）の懸濁液（ $1 \times 10^7$  CFU/mL）をそれぞれ接種し、20°Cで48時間の発酵処理を行った。図1に示したように、初発のpHは7.22であったが、分離株の添加によりpH低下の

傾向（14株がpH7.18以下）が見られた。また、*S. lentus*（菌株番号7, 8, 17）を接種した発酵物は異臭が感じられたが、他の菌株を接種した発酵物は特に感じなかった。そこで、異臭が無く、pH低下に優れた菌株番号6の分離株（*S. saprophyticus*）を以下の実験に供した。

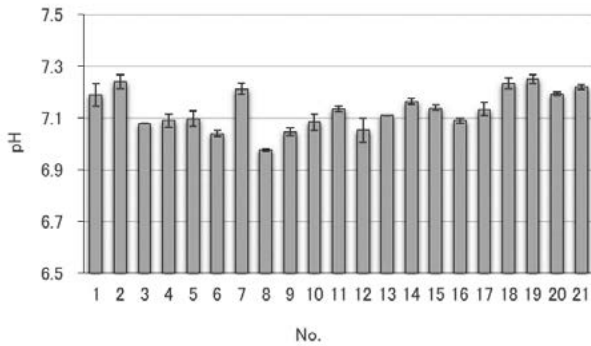


図1 *Staphylococcus*属細菌分離株の接種によるpH変化  
No.1~17:表1の菌株, No.18:コントロール菌株 (*S. saprophyticus* JCM2427T), No.19:コントロール菌株 (*S. xylosus* JCM2418T), No.20:菌株接種なし, No.21:原料ニシン(冷蔵保存)  
エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

### (2) スターター菌株添加による身欠きニシンの試作

選抜した菌株番号6を添加して8分乾身欠きニシンを試作した。同様の試作を4回繰り返して、マンニット食塩寒天培地を用いての生菌数を調べた(図2)。スターター無添加区では初発菌数が2.91Log CFU/gであり、乾燥後は3.82Log CFU/gであった。一方、スターター添加区では初発菌数が5.22Log CFU/gであり、乾燥後には7.93Log CFU/gになり、乾燥の経過とともに*Staphylococcus*属細菌数が顕著に増加した。

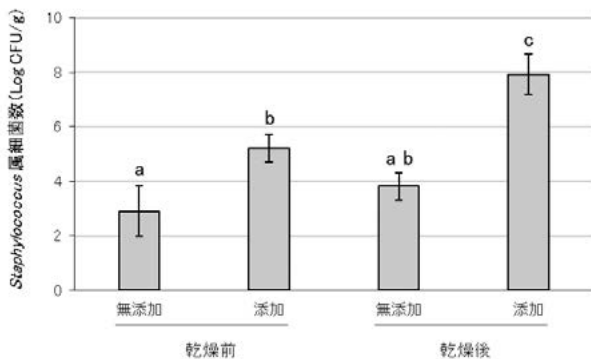


図2 試作身欠きニシンの*Staphylococcus*属細菌数  
異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey,  $p < 0.05$ ).  
エラーバーは標準誤差を示す (n=4).

また、本研究で用いたMultiplex-PCR法において、*S. saprophyticus*では特異的な221bpのバンドが現れる<sup>5) 7)</sup>。

そこで、乾燥後の身欠きニシンについて、培地表面上のコロニーを鈎菌(各16コロニー)し、Multiplex-PCRにより調べた結果、スターター無添加区では*S. saprophyticus*であると認められるコロニーが6/16であったのに対して、スターター添加区では全コロニー(16/16)が添加菌種の*S. saprophyticus*であった。

### (3) 試作身欠きニシンの酢酸量およびアミノ酸量

酢酸量は図3に示した。乾燥前は0.1mg/100gであったが、乾燥後にはスターター無添加区で1.1mg/100g、スターター添加区では無添加区の約4倍の4.2mg/100gが検出された。

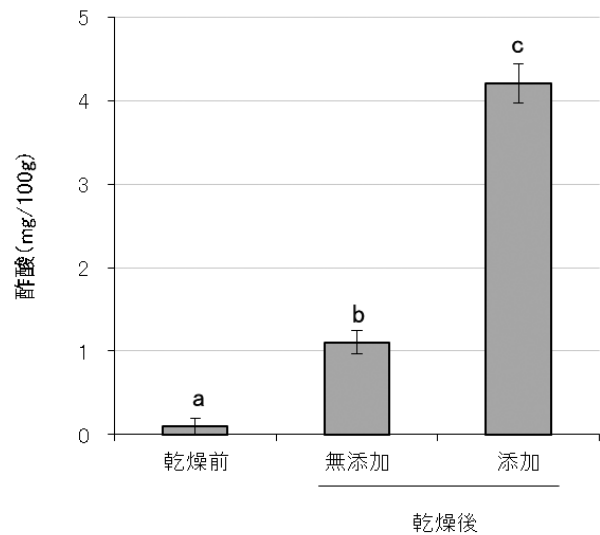


図3 試作身欠きニシンの酢酸量  
異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey,  $p < 0.01$ ).  
エラーバーは標準誤差を示す (n=4).

乾燥後の遊離アミノ酸量(試作身欠きニシン3回分について測定)は表2に示した。全量はスターター無添加区で1224.8±125.4mg/g DRY, 添加区で1517.6±186.1mg/g DRYであった。また、分析した全てのアミノ酸がスターター無添加区より添加区で多く検出された。

## 3. 考察

マンニット食塩寒天培地では*Staphylococcus*属の他、*Micrococcus*属などのグラム陽性球菌が増殖する。Maurielloら<sup>10)</sup>は南イタリアのさまざまな種類の発酵ソーセージからマンニット食塩寒天培地を用いてグラム陽性球菌を分離した。最も頻りに単離された種は*S. saprophyticus*, *S. xylosus*および*S. equorum*であったが、それら菌種は異なるソーセージ内に均等に分布しているの

表2 試作身欠きニシンの遊離アミノ酸分析

アミノ酸	無添加 (mg/g DRT)	添加 (mg/g DRT)
タウリン	454.5±38.2	487.3±64.9
アスパラギン酸	20.8±5.0	24.2±9.6
トレオニン	25.3±1.5	30.7±3.0
セリン	47.8±6.5	53.6±5.5
グルタミン酸	65.6±23.1	74.8±32.6
グリシン	171.2±41.2	175.6±67.2
アラニン	139.0±22.4	174.6±28.3
システイン	9.5±1.4	12.3±3.2
バリン	22.8±4.3	29.7±5.4
メチオニン	15.0±1.9	19.7±5.0
イソロイシン	12.5±3.0	16.5±2.6
ロイシン	20.5±6.0	27.5±6.5
チロシン	10.6±2.1	13.7±1.1
フェニルアラニン	20.8±2.8	24.4±1.8
リシン	79.9±54.3	208.8±33.9
ヒスチジン	45.0±18.8	58.8±53.5
アルギニン	16.6±7.4	25.6±3.5
プロリン	47.5±6.9	59.8±9.9
総遊離アミノ酸	1224.8±125.4	1517.6±186.1

値は平均値±標準誤差を示す (n=3).

ではなく、特定のソーセージに偏在していることを示した。本研究において、8カ所の加工場で製造された八分乾身欠きニシンから合わせて6種14株の*Staphylococcus*属細菌が分離され、加工場ごとに異なる分布の傾向が認められた。また、そのうち、*S. saprophyticus*が半数(7株)を占め、少なくとも5加工場の身欠きニシンに存在した。前報<sup>5)</sup>でも同様に*S. saprophyticus*が優勢菌種として検出されていることから、身欠きニシンの製造において*S. saprophyticus*が増殖しやすい環境にあると考えられる。

身欠きニシンから分離選抜された*S. saprophyticus*株をスターターとした身欠きニシンの試作において、スターター無添加区よりも*S. saprophyticus*が顕著に増殖し、風味形成に関与する酢酸量が約4倍の4.2mg/100g(0.0042%)であった。酢酸の嗅覚閾値<sup>11)</sup>は0.0374~0.355ppmであり、酸味閾値<sup>12) 13)</sup>は0.0012~0.002%との報告がある。試作したスターター添加の身欠きニシンの酢酸量は0.0042%であり、この値は酸臭および酸味を感じる状態であろうと推察される。遊離アミノ酸の総量は1517.6±186.1mg/g DRYで、対照区(1224.8±125.4mg/g DRY)よりも多く、また、分析した全アミノ酸が増加した。以上の結果は身欠きニシン製造における乾燥工程でスターター菌株が優勢に増殖し、酢酸および遊離アミノ酸を生成して風味向上に働くことを示唆した。

Berdagueら<sup>14)</sup>はドライソーセージ中のフレーバー

物質の生成に対する*Staphylococcus*属細菌を含むスターターの影響を調べ、スターター添加がフレーバー物質の生成に大きな影響を及ぼすことを示した。Olesenら<sup>15)</sup>はスターター添加による発酵ソーセージのフレーバー物質生成を調べ、大部分の揮発成分が熟成の進行とともに増加し、それがスターター菌株に依存することを報告した。本研究では風味に関して酢酸および遊離アミノ酸のみの分析であったが、身欠きニシンにおいても*Staphylococcus*属細菌が揮発性のフレーバー物質生成に関与している可能性が推察される。

最近、*Staphylococcus*属細菌が発酵魚製品の製造において風味に関与していることを示す複数の報告が出された。Jiら<sup>16)</sup>は伝統的な中国の発酵魚からメタプロテオミクスのアプローチによって*Staphylococcus*属細菌が風味の生成につながるアミノ酸の代謝に寄与することを示した。Zengら<sup>17)</sup>は中国の伝統的な低塩発酵魚であるスアンユウの微生物菌叢を調べ、*S. xylosus*および*S. saprophyticus*が発酵熟成中の優勢な微生物菌叢を構成し、タンパク質分解および脂肪分解活性を有して風味に関与していることを示した。

本研究では身欠きニシンから分離した*S. saprophyticus*の単菌株のみをスターターとした試験であったが、異なるスターター菌株または複数のスターター細菌を用いることで風味のコントロールが可能になると考えられ、多様なスターター菌株の取得および評価が今後の課題である。

#### 4. 要約

メーカー製造の身欠きニシンから風味向上を目的に *Staphylococcus*属細菌を分離選抜し、当該菌株をスターターとした身欠きニシンの試作によりスターターとしての有効性を検討した。

八分乾身欠きニシンから分離した *Staphylococcus*属細菌株は、*S. saprophyticus*が7株、*S. sciuri*および*S. lentus*が各3株、*S. xyloso*が2株、*S. cohnii*および*S. hominis*が各1株であった。その中から、加熱殺菌処理したミンチ状ニシンに接種して、異臭が無く、pH低下に優れた *S. saprophyticus*分離株の1株を選抜し、当該菌株をスターターに身欠きニシンを試作した。スターター添加による身欠きニシン試作では、無添加区よりも *S. saprophyticus*が顕著に増殖し、風味形成に関与する酢酸および遊離アミノ酸が増加した。これらの結果は身欠きニシン製造における乾燥工程でスターター菌株が優勢に増殖し、風味向上に働くことを示唆した。

#### 文献

- 1) Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. and Grazia, L. (1997). Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.*, **14**, 47-53.
- 2) Drosinos, E.H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. and Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional greek fermented sausage. *Meat Sci.*, **69**, 307-317.
- 3) Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. and Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 271-284.
- 4) Corbière Morot-Bizot, S., Leroy, S. and Talon, R. (2007). Monitoring of staphylococcal starters in two french processing plants manufacturing dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 238-244.
- 5) 中川良二, 能登裕子, 八十川大輔, 釜谷豊和 (2007). 八分乾ミガキニシン製造工程における菌叢変化, *食科工*, **54**, 26-32.
- 6) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸 (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフロー解析への応用, *食科工*, **45**, 58-65.
- 7) Morot-Bizot, S. C, Talon, R. and Leroy, S. (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1087-1094.
- 8) 山中洋之, 金井聡, 秋元政信, 鮫島隆, 有原圭三, 伊藤良 (2003). *Staphylococcus xyloso*を用いて調製した発酵豚肉エキスの注入によるロースハムの風味向上, *食科工*, **50**, 272-277.
- 9) 小林哲也, 田中彰, 八十川大輔, 川上誠 (2018). 製造環境から分離したブドウ球菌を添加した食肉製品の風味特性, *道総研食品加工研究センター研究報告*, **13**, 25-33.
- 10) Mauriello, G, Casaburi, A, Blaiotta, G and Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.*, **67**, 149-158.
- 11) 戸田貞子, 三橋富子, 香西みどり, 畑江敬子 (2010). 高齢者における嗅覚の閾値. 福岡, 平成22年度日本調理科学会大会, セッションID, 2E-p7.
- 12) 前田清一, 中尾俊 (1963). 各種酸類の酸味について (第1報) 味覚試験による閾値の測定, *家政学雑誌*, **14**, 149-154.
- 13) 楠瀬千春, 大里進子, 大屋良子 (2006). 女子学生の塩味・甘味・苦味の閾値と食物摂取状況との関連, *栄養学雑誌*, **64**, 195.
- 14) Berdague, J. L, Montel, P., Montel, M. C. and Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Sci.*, **35**, 275-287.
- 15) Olesen, P. T., Meyer, A. S. and Stahnke, L. H. (2004). Generation of flavour compounds in fermented sausages-the influence of curing ingredient, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Sci.*, **66**, 675-687.
- 16) Ji, C., Zhang, J., Lin, X., Han, J., Dong, X., Yang, S., Yan, X. and Zhu, B. (2017). Metaproteomic analysis of microbiota in the fermented fish, *Siniperca chuatsi*. *Food Sci. Technol.*, **80**, 479-484.
- 17) Zeng, X., Chen, X. and Zhang, W. (2015).

Characterization of the microbial flora from Suan yu, a Chinese traditional low-salt fermented fish. *J. Food Process Preserv.*, **40**, 1093-1103.

#### 引用URL

i) 岩内海産商協同組合, 身欠きニシンの製造工程,  
<https://iwanai-kaisansyo.jp/kn>