

報文

市販鮎寿司に含まれる微生物叢解析と成分分析
Analysis of microbial flora and chemical compositions in the commercial funazushi

塩田隆¹, 吉山洋子², 後藤美帆², 加藤早也花², 佐藤咲², 塩入ヶ谷郁²,
島純^{2,3}, 田邊公一^{*2,3}, 橋本道範⁴

(投稿日: 2024.3.22, 受理日: 2024.4.17)

鮎寿司は、魚と飯を発酵させて作られる伝統的な発酵食品であり、滋賀県で古くから作り続けられてきた。しかし、鮎寿司の発酵に寄与する微生物叢や有機酸などの成分についての情報は限定的であり、多検体を網羅的に調査した研究例は少ない。本研究では、滋賀県内 27 か所の製造販売所で市販されている鮎寿司を購入し、購入先への聞き取り調査を行うとともに、骨硬度測定、飯の微生物分析、元素分析、有機酸分析を行った。次世代シーケンサー法による乳酸菌叢解析の結果、鮎寿司に含まれる微生物は主に *Lactobacillus* 属の乳酸菌であり、*Lactobacillus acetotolerans*、*Lentilactobacillus buchneri* の 2 種の乳酸菌が優占種となるサンプルが多く観察された。また、近江八幡市で製造された鮎寿司は全て *L. buchneri* が優占種であった。鮎寿司に含まれる成分については、*L. acetotolerans* 優占種群は *L. buchneri* 優占種群より、高い乳酸含有量を示した一方、カリウムと酢酸については低値を示した。以上の結果より、滋賀県内の市販鮎寿司に含まれる微生物叢には製造地域による特徴があり、優占種となる乳酸菌種が、一部の微量元素や有機酸の含有量に影響を及ぼす可能性が示された。

キーワード: 鮎寿司, 乳酸菌, 発酵食品, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lentilactobacillus buchneri*

1. 緒言

近年、日本各地で多くの発酵食品が注目されており、その中の一つに滋賀県の郷土料理である鮎寿司が挙げられる。鮎寿司は、和歌山の鯖寿司、岐阜県の鮎寿司と並び、魚と飯を乳酸発酵させるナレズシの一つである。また鮎寿司は、寿司の原型とされ、保存食でありながら、年始に食される行事食、整腸効果をもつ薬としての側面をもち、古くから滋賀県民に親しまれてきた。

鮎寿司は、主に琵琶湖の固有亜種であるニゴロブナを原料とし、内臓や鰓をとる下処理、塩切り（塩漬け）の工程を経て、夏

の土用の頃から正月にかけて飯漬けを行う。このような大まかな製造方法はどの製造者も同様であるが、塩切りの期間や飯漬けの方法など細かい点が異なり、風味や味が製品により異なるとされている。

鮎寿司の風味を特徴づける酸味については、有機酸が関連すると考えられており、Fujii らの報告¹⁾では、鮎寿司には、乳酸、酢酸、プロピオン酸、ピルビン酸、オキサロ酢酸など多数の有機酸が含まれていることが明らかにされている。しかし、有機酸以外の化学成分に関する研究報告はなく、また食感を大きく左右する身や骨の固さなどの鮎寿司の食感（テクスチャー）を調べた例もこれまでにない。

鮎寿司の発酵に寄与する微生物に関しては、いくつかの商品や試作品に関する情報が報告されている。鮎寿司は、他のなれずしと同様に乳酸発酵によって製造されるため、乳酸菌種が最も多く分離される微生物であると考えられるが、Isobe ら²⁾や Tsuda ら³⁾、Tanabe ら⁴⁾の報告では、*Lentilactobacillus buchneri* が多く分離され

1 龍谷大学大学院 農学研究科
2 龍谷大学 農学部
3 龍谷大学 発酵醸造微生物リソース研究センター
520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5
4 滋賀県立琵琶湖博物館
525-0001 滋賀県草津市下物町 1091
* 著者連絡先
E-mail: ktanabe@agr.ryukoku.ac.jp

表 1. 購入した鮎寿司の製造地域、原材料

	製造地域	原材料①	原材料②
Y1	長浜市	鮎（にごろぶなメス子持ち）	米、食塩、焼酎
Y6	近江八幡市	鮎（琵琶湖産ニゴロ鮎）	米（滋賀県産）、塩、酒
Y7	近江八幡市	ふな（琵琶湖産）（子持ち）	米、塩
Y9	長浜市	ふな	米、塩
Y10	蒲生郡竜王町	ニゴロ鮎（国産）	米、塩、酒
Y11	長浜市	鮎（琵琶湖産・オス）	米（国産）、塩
Y12	近江八幡市	湖魚（琵琶湖産・ニゴロ鮎）	米（滋賀県産）、塩、清酒
Y14	長浜市	鮎	米、塩
Y16	彦根市	源五郎鮎（大阪府産・養殖）	米、塩、酒
Y17	長浜市	鮎（滋賀県産）	米（長浜市産）、塩、酒
Y18	長浜市	ふな（香川産）	近江米（コシヒカリ）、塩
Y19	米原市	鮎	近江こしひかり米、塩、焼酎
Y20	彦根市	にごろ鮎	米（滋賀県産）、塩、焼酎
Y22	犬上郡豊郷町	鮎（国内産）	米（滋賀県産）、塩、酒
Y23	彦根市	ふな（国内産）	米（滋賀県産）、食塩
Y24	彦根市	ふな（滋賀県産）	米（滋賀県産）、食塩
Y25	東近江市	鮎（国産）	米、みりん、酒、塩
Y26	東近江市	鮎（国産）	米（近江米）、酒、みりん、米酢、塩
Y28	長浜市	記載なし	
Y29	東近江市	鮎（滋賀県産、子持）	白米（国産）、酒、塩
Y31	近江八幡市	にごろ鮎（琵琶湖産）	米、（国産）、食塩
Y32	大津市	鮎（琵琶湖産）	米（近江米）、塩、酒
Y33	高島市	鮎[ニゴロブナ]（琵琶湖）	米（滋賀県）、塩、酒
Y39	高島市	ニゴロブナ（琵琶湖産）	米（国産）、塩
Y40	長浜市	鮎（琵琶湖産）	塩、酒、米（一部小麦を含む）
Y41	高島市	ニゴロ鮎（琵琶湖産）	米（滋賀県高島市産）、塩、味醂、でん粉
Y43	大津市	ニゴロブナ（琵琶湖産）	米（滋賀県産）、塩

原材料①を鮎，原材料②を鮎以外の原材料とした。表記については，商品記載の通りとしている。番号については，鮎寿司以外のナレズシも同時に処理したため，鮎寿司だけに限定してサンプル仕分けした都合で欠番がある。

ることが知られている。一方，国内で製造される鮎寿司以外のなれずしにおいては，岐阜県で食されている鮎寿司で *Lactilactobacillus sakei*⁵⁾，和歌山で食されている鯖寿司で *Lactiplantibacillus plantarum*⁶⁾ が乳酸菌の優占種であったとの報告がある。

これまでの鮎寿司に関する化学成分および微生物叢に関する研究報告は，鮎寿司の風味・食感を客観的に評価するには十分ではなく，材料や製造方法，微生物叢との関連を推定することも困難である。本研究では，滋賀県内において市販の鮎寿司を 27 検体収集し，製造方法の聞き取り調査を実施し，微生物叢，骨の硬度，有機酸量，微量元素量を網羅的に分析し，得られたデータ

の相関を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

(1) 材料

2023 年 1 月上旬，滋賀県内のスーパーや道の駅等で市販されている 27 種類の鮎寿司を購入した（表 1）。鮎の種類は，ニゴロブナまたはゲンゴロブナであり，産地が明記されていない場合は，種が不明のものも含まれていた可能性があった。鮎以外の原材料として表記されていたのは，米と塩が主で，酒，みりんを使用したものも存在した。

(2) 方法

1) 聞き取り調査

鮎寿司の購入元への聞き取り調査は、龍谷大学・人を対象とする研究に関する倫理審査委員会にて承認された後に実施した(申請番号:2022-57)。アンケート用紙を購入先に郵送し、回答を得た。以下の12点を質問項目に設定した。(鮎の種類、鮎の産地、塩きり期間、飯漬けの期間、米の品種、精米歩合、飯漬けの桶の大きさ、桶に水を張るか、飯漬け桶の保管場所、飯漬けの間の空調による温度管理、出荷までの保存方法、その他)。27件中、18件から回答を得て、有効な回答のみについて解析を行った。

2) 骨硬度測定

鮎の骨の固さはクリープメーター(RHEONER2/RE2-3305C, 山電株式会社)を用いて行った。鮎を3枚におろした後、背骨を摘出し、可能な限り身をスプーンでそぎ落とした。扁平で形状が均一であった尾に近い部分を1.5cm程度ごとに裁断し、3回測定分を分取し、測定に用いた。サンプルとの接面に矢印形の治具(No. 49)を当て、200Nロードセル(LC2-3305B-200N)を用いて最大200Nの力をかけて破断時の応力測定を行った。サンプルステージの温度は20°Cで実施した。

3) 飯の微生物分析

鮎寿司の魚体近傍の飯を乳酸菌叢解析の試料として用いた。各試料0.5gからDNA抽出キットNucleoSpin® Soil (Takara Bio)を用いてDNAを抽出した。16S rDNAのV3/V4領域を以下のプライマーを用いてPCRで増幅した。

1st_PCR_V3V4f_MIX (341f) : ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG

1st_PCR_V3V4r_MIX (805r) : GTGACTG GAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCC

PCRには、SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Takara Bio)を用い、以下の反応条件で増幅反応を行った。

(PCR 反応液組成)

SapphireAmp Fast PCR Master Mix

(2×Premix) 10 µl

10 mM Forward primer 1.0 µl

10 mM Reverse primer 1.0 µl

Template DNA 1.0 µl

H₂O (滅菌純水) 7 µl

Total 20 µl

(反応温度)

94°C 2 min

94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 1 min

72°C 5 min

} 35 cycles

1st PCR 反応液を生物技研株式会社に送付し、2-step tailed PCRによりライブラリーを作製した後、MiSeq システムおよび MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 株式会社)を用いて、アンプリコンシーケンス解析を実施した。リードシーケンスの解析には EzBioCloud 16S Database (CJ Bioscience, Inc.)を用いた。シーケンスデータは DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録した (BioProject 番号: PRJDB17791)

4) 飯の元素分析

飯の一部は飯重量の5倍の滅菌したMQ水で分散し、20分間100rpmで振盪後、3,000rpmで5分間遠心し、得られた上清を用いて元素分析に用いた。溶存態金属成分濃度(リン、鉄、銅、亜鉛、カルシウム、アルミニウム、マグネシウム、カリウム、マンガン)は、得られた抽出水をICP-OES instrument (iCAP 7400 Duo; Thermo Scientific)を用いて測定した。

5) 飯の有機酸分析

上記抽出水の乳酸および酢酸濃度については、F-キット乳酸、F-キット酢酸(J. K. international)を、それぞれ用いて測定した。3回の独立した測定値より各試料の平均濃度と標準偏差を求めた。

(3) 統計解析

各群間の差の検討には、対応のないt検定を用いた。統計解析にはMicrosoft Excelの分析ツールを用いた。有意水準は5%の両側確率をもって有意とした。なお、数値はそれぞれの実験における測定結果の平均値±標準偏差で示した。

3. 結果

(1) 市販鮎寿司の乳酸菌叢解析

2023年1月上旬、滋賀県内で販売されている鮎寿司のうち、魚体がスライスされていない27検体を購入し、実験に供した。鮎寿司検体の飯からDNAを抽出し、16Sリボ

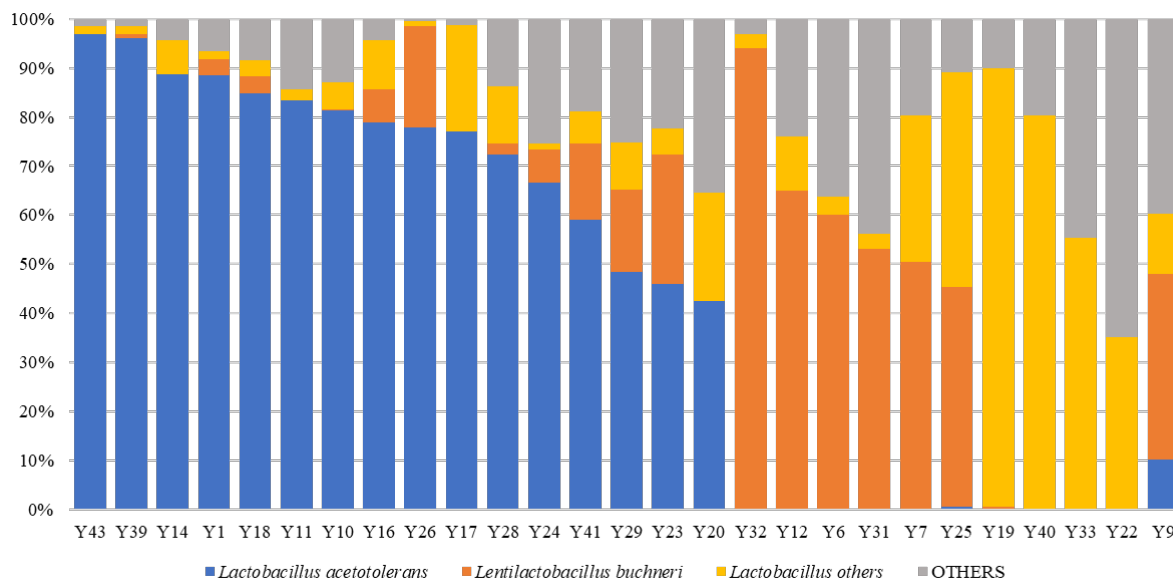


図 1. 鮎寿司の乳酸菌叢解析結果

滋賀県内で販売されている鮎寿司を次世代シーケンサーにより解析し、検体に含まれる細菌の組成を示した。左から、*Lactobacillus acetotolerans* 優占種群 (*L. acetotolerans* の割合が高い順に左から Y43, Y39, Y14, Y1, Y18, Y11, Y10, Y16, Y26, Y17, Y28, Y24, Y41, Y29, Y23, Y20), *Lentilactobacillus buchneri* 優占種群 (*L. buchneri* の割合が高い順に左から Y32, Y12, Y6, Y31, Y7, Y25), その他の *Lactobacillus* 属優占種群 (Y19, Y40, Y33), *Lactobacillus* 属以外の種が優占種である群 (Y22, Y9) に並べて示した。

ソーム遺伝子の V3/V4 領域を PCR で増幅した。PCR 産物を次世代シーケンサーにより解析し、検体に含まれる細菌の組成を調べた。その結果、27 検体中 25 検体 (92.6%) において *Lactobacillus* 属の細菌が細菌叢の大半を占めていた。また、それぞれのサンプルにおいて最も多く含まれている種を優占種とし、*L. acetotolerans* 優占種群 (16 サンプル), *L. buchneri* 優占種群 (6 サンプル), その他の *Lactobacillus* 属の優占種群 (以下 *L. others* 優占種群) (3 サンプル), *Lactobacillus* 属以外の種が優占種である群 (2 サンプル) に群分けすることが可能であった (図 1)。

(2) 市販鮎寿司の優占種と鮎寿司製造場所の関連

購入した鮎寿司の製造場所を滋賀県の地図上に示し、前項で分類した優占種群を A; *L. acetotolerans* 優占種群, B; *L. buchneri* 優占種群, O; *L. others* 優占種群としてあらわした (図 2)。また、鮎寿司製造場所 (市町村) における各優占種群に分類される検体の数を示した (表 2)。*L. acetotolerans* 優占種群は複数の市町に分散していたが、*L. buchneri* 優占種群鮎寿司は近江八幡市に多い傾向がみとめられた。

次に、各優占種群において、鮎寿司製造場所の緯度の平均値を示した (図 3-1)。*L. acetotolerans* 優占種群では北緯 35 度 28 分 95 秒 3832 ± 37 分 74 秒 9195, *L. buchneri*

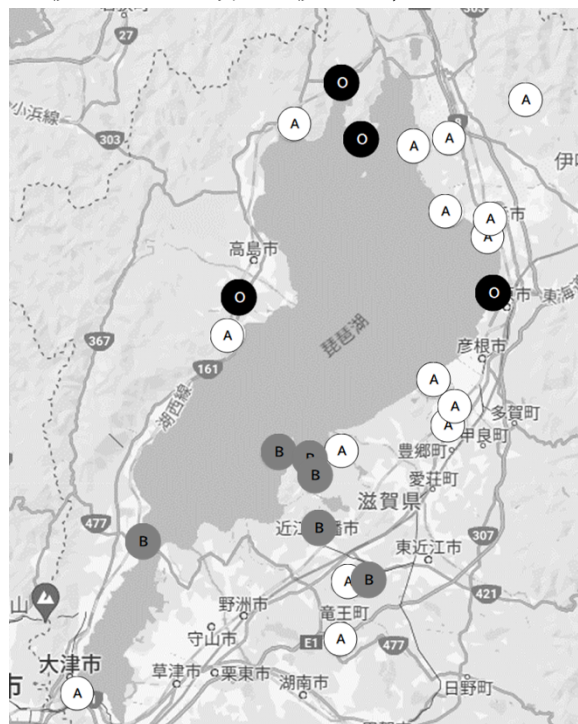


図 2. 優占種群と製造地域の分布
購入した鮎寿司の製造場所を滋賀県の地図上に優占種群別に示した。
A; *L. acetotolerans* 優占種群, B; *L. buchneri* 優占種群, O; *L. others* 優占種群

表 2. 市町村ごとの検体数

	<i>L. acetotolerans</i> 優占種群 (n=16)	<i>L. buchneri</i> 優占種群 (n=6)	<i>L. others</i> 優占種群 (n=3)
大津市	1	1	0
東近江市	2	1	0
近江八幡市	0	4	0
竜王町	1	0	0
彦根市	4	0	0
米原市	0	0	1
長浜市	6	0	1
高島市	2	0	1

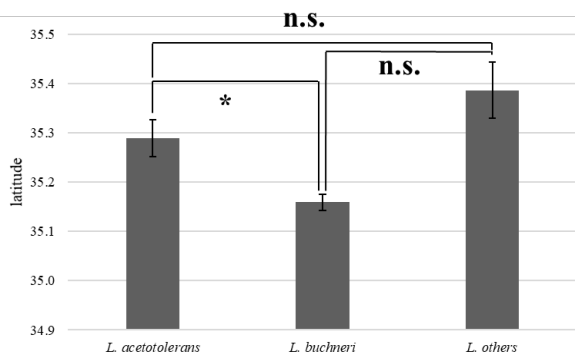


図 3-1. 優占種群と鮎寿司製造地域の緯度の平均値

n.s.: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

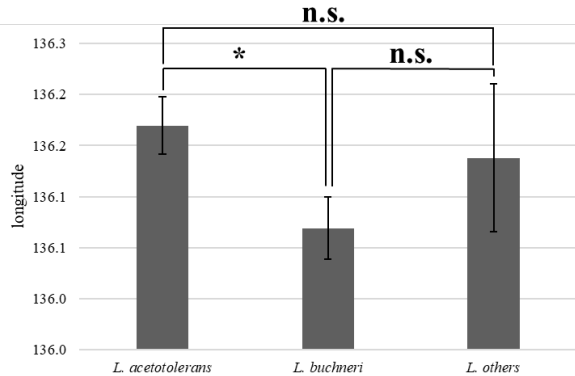


図 3-2. 優占種群と鮎寿司製造地域の経度の平均値

n.s.: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

優占種群では北緯 35 度 15 分 92 秒 9137 ± 16 分 72 秒 1906, *L. others* 優占種群では北緯 35 度 38 分 69 秒 6640 ± 56 分 75 秒 1340 であった. *L. acetotolerans* 優占種群の緯度は *L. buchneri* 優占種群に比べて有意に高値であった ($0.01 < p < 0.05$).

また, 各優占種群において, 鮎寿司製造場所の経度の平均値を示した (図 3-2). *L. acetotolerans* 優占種群では東経 136 度 16 分 95 秒 1622 ± 28 分 22 秒 6648, *L. buchneri* 優占種群では東経 136 度 6 分 88 秒 7228 ± 30 分 51 秒 1396, *L. others* 優占種群では東経 136 度 13 分 80 秒 4394 ± 72 分 48 秒 6382 であった. *L. acetotolerans* 優占種群は *L. buchneri* 優占種群に比べて有意に高値であった ($p < 0.01$).

(3) 市販鮎寿司の乳酸菌の優占種と抽出水中のミネラル濃度, 有機酸量との関係

抽出水の定量を行った乳酸および酢酸, 溶存態金属元素のうち, リン, 鉄, 亜鉛, カルシウム, マグネシウム, カリウムについて解析を行った. 銅, アルミニウム, マンガンについては, 定量限界値以下であったため省いた. 優占種群ごとに, ミネラル濃度, 有機酸量を示した (表 3).

各優占種群と, カリウム濃度を比較した結果を図 4-1 に示した. *L. acetotolerans* 優占種群では 17.16 ± 4.33 mM, *L. buchneri* 優占種群では 20.29 ± 5.80 mM, *L. others* 優占種群では 15.67 ± 4.39 mM であった. *L. buchneri* 優占種群は *L. acetotolerans* 優占種群と比べ, 有意に高値であった ($0.01 < p < 0.05$).

表 3. 優占種群と鮎寿司飯に含まれるミネラル, 有機酸の比較

	<i>L. acetotolerans</i> 優占種群 (n=16)		<i>L. buchneri</i> 優占種群 (n=6)		<i>L. others</i> 優占種群 (n=3)		
	Mean \pm	SD	Mean \pm	SD	Mean \pm	SD	
P (mM)	56.42 \pm	13.07	65.29 \pm	23.19	74.79 \pm	25.39	n.s.
Fe (mM)	0.02 \pm	0.01	0.02 \pm	4.43	0.02 \pm	0.00	n.s.
Zn (mM)	0.25 \pm	0.09	0.23 \pm	4.37	0.20 \pm	0.05	n.s.
Ca (mM)	82.56 \pm	39.35	92.78 \pm	48.80	102.14 \pm	43.21	n.s.
Mg (mM)	7.05 \pm	1.61	9.70 \pm	3.94	9.89 \pm	3.53	n.s.
K (mM)	17.16 \pm	4.33	20.29 \pm	5.80	15.67 \pm	4.39	$0.01 < p < 0.05$ ^{a)}
乳酸 (%w/w rice)	2.48 \pm	0.91	1.72 \pm	0.61	2.39 \pm	0.78	$0.01 < p < 0.05$ ^{a)}
酢酸 (%w/w rice)	0.19 \pm	0.13	0.43 \pm	0.11	0.15 \pm	0.09	$0.01 < p < 0.05$ ^{a)} $p < 0.01$ ^{b)}

a) *L. acetotolerans* 優占種群 vs *L. buchneri* 優占種群

b) *L. buchneri* 優占種群 vs *L. others* 優占種群

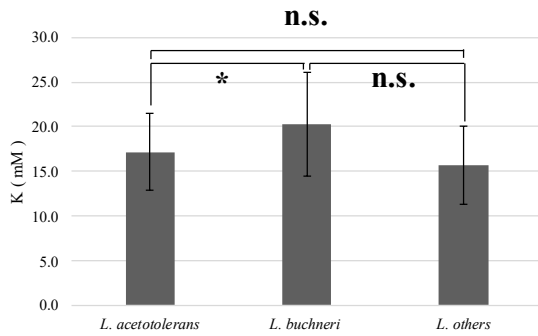


図 4-1. 優占種群と鮎寿司飯に含まれるカリウム含有量

n.s.: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

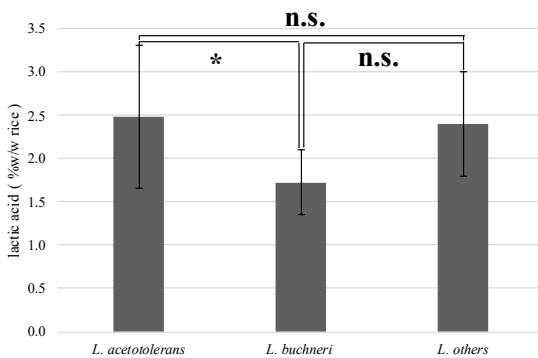


図 4-2. 優占種群と鮎寿司飯に含まれる乳酸含有量

n.s.: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

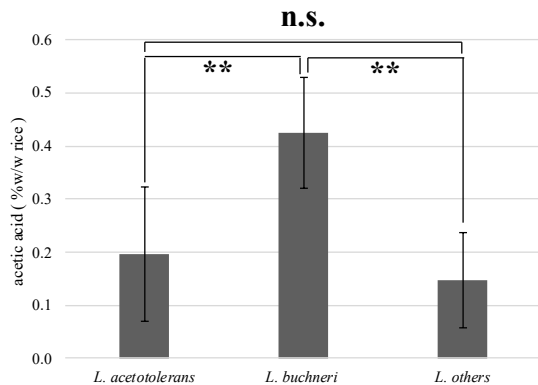


図 4-3. 優占種群と鮎寿司飯に含まれるに
含まれる酢酸含有量

n.s.: $p > 0.05$, *: $0.01 < p < 0.05$, **: $p < 0.01$

次に各優占種群と、乳酸含有量を比較した(図 4-2)結果、*L. acetotolerans* 優占種群では 2.48 ± 0.91 mM, *L. buchneri* 優占種群では 1.72 ± 0.61 mM, *L. others* 優占種群では 2.39 ± 0.78 mM であった。*L. acetotolerans* 優占種群は *L. buchneri* 優占種群と比べ、有意に高値であった ($0.01 < p < 0.05$)。

各優占種群において、酢酸含有量を比較した(図 4-3)。*L. acetotolerans* 優占種群では 0.19 ± 0.13 % w/w rice, *L. buchneri* 優占種群では 0.43 ± 0.11 % w/w rice, *L. others* 優占種群では 0.15 ± 0.09 % w/w rice であった。*L. buchneri* 優占種群は、*L. acetotolerans* 優占種群と *L. others* 優占種群と比べ、有意に高値であった(共に $p < 0.01$)。

(4) 骨硬度と鮎寿司

及び飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量との関係

市販鮎寿司の魚体から背骨を摘出し、クリップメーターを用いて 50%変形時点の応力を測定した。3 回測定した応力の平均値を骨硬度とし、高値のサンプルから順番に 9 サンプルずつ、それぞれ上位、中位、下位と分類し、鮎寿司飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量と比較した(表 4)。また、ミネラルの測定値が欠損している Y29 を下位群より除外した。リン、カルシウム、マグネシウム濃度は、骨硬度上位群で高値を示す傾向がみられた。乳酸量は、骨硬度上位群、中位群で高値を示す傾向がみられた。酢酸量は、骨硬度上位群から下位になるにつれて高値となる傾向がみられた。

表 4. 骨硬度と鮎寿司飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量の比較

		上位 (n=9)		中位 (n=9)		下位 (n=8)		
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
P	(mM)	63.85	± 22.87	58.25	± 10.30	59.50	± 7.23	n.s.
Fe	(mM)	0.02	± 0.01	0.02	± 0.01	0.02	± 0.01	n.s.
Zn	(mM)	0.23	± 0.09	0.25	± 0.10	0.19	± 0.09	n.s.
Ca	(mM)	99.57	± 54.38	78.46	± 18.43	79.55	± 14.37	n.s.
Mg	(mM)	8.82	± 3.34	7.62	± 2.06	7.62	± 1.73	n.s.
K	(mM)	18.69	± 7.25	18.32	± 3.19	18.31	± 2.89	n.s.
乳酸	(%w/w rice)	2.29	± 0.72	2.32	± 0.81	1.79	± 0.84	n.s.
酢酸	(%w/w rice)	0.14	± 0.12	0.26	± 0.13	0.31	± 0.19	n.s.

(5) 製造工程の違いと鮎寿司及び飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量との関係

鮎寿司製造工程の聞き取り調査では、温度管理については14件、桶に水を張る操作の有無については、15件の有効な回答を得ることができた。鮎寿司製造工程の飯漬けにおける温度管理の有無について、飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量との関連を調べた(表5)。飯漬け時に温度管理を行っている群は温度管理を行っていない群と比べ、鉄濃度が有意に高値であった(0.01 < p < 0.05)。リン、カルシウム、マグネシウム、カリウム、乳酸、酢酸濃度は、温度管理を行っている群で高値を示す傾向がみられた。また、亜鉛濃度は飯漬け時の温度管理を行っていない群で高値を示す傾向がみられた。

鮎寿司製造工程の飯漬けにおける桶への水張りの有無について、飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量との関連を検討した(表6)。鉄、カリウム、酢酸濃度については、水を張っている群で高値を示す傾向がみられた。また、リン、亜鉛、カルシウム、マグネシウム、乳酸濃度は、水を張っていない群で高値を示す傾向がみられた。

表 5. 飯漬け工程での温度管理と鮎寿司飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量の比較

	温度管理無し (n=12)			温度管理有り (n=2)			
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	
P (mM)	64.14	±	16.97	58.68	±	0.20	n.s.
Fe (mM)	0.02	±	0.01	0.01	±	0.00	0.01 < p < 0.05
Zn (mM)	0.21	±	0.04	0.23	±	0.08	n.s.
Ca (mM)	90.11	±	27.19	73.04	±	8.45	n.s.
Mg (mM)	9.32	±	2.57	8.16	±	2.90	n.s.
K (mM)	19.40	±	3.18	15.83	±	2.70	n.s.
乳酸 (%w/w rice)	2.32	±	0.52	1.77	±	0.38	n.s.
酢酸 (%w/w rice)	0.26	±	0.15	0.25	±	0.00	n.s.

表 6. 飯漬け工程での桶への水張りとは鮎寿司飯に含まれるミネラル濃度、有機酸量の比較

	水を張る (n=11)			水を張らない (n=4)			
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	
P (mM)	61.80	±	16.90	65.78	±	11.06	n.s.
Fe (mM)	0.02	±	0.01	0.01	±	0.00	n.s.
Zn (mM)	0.20	±	0.04	0.31	±	0.12	n.s.
Ca (mM)	84.18	±	27.48	94.40	±	17.93	n.s.
Mg (mM)	8.83	±	2.67	8.95	±	3.18	n.s.
K (mM)	18.96	±	2.69	17.39	±	5.40	n.s.
乳酸 (%w/w rice)	2.14	±	0.54	2.45	±	0.38	n.s.
酢酸 (%w/w rice)	0.27	±	0.14	0.19	±	0.12	n.s.

4. 考察

滋賀県の伝統的な発酵食品である鮎寿司は、近年の発酵食品ブームによって注目される機会が増加した。しかし、鮎寿司の製造方法や含まれる成分に関する詳細な研究はなされておらず、食味の客観的評価方法も確立されていない⁷⁾。本研究では、滋賀県内において市販の鮎寿司を多検体収集し、製造方法の聞き取り調査を実施し、微生物叢、骨の硬度、有機酸量、ミネラル量を網羅的に分析し、各データとの相関を明らかにした。

滋賀県内で販売されている鮎寿司の乳酸菌叢解析では、*Lactobacillus* 属を優占種とする3群に大別することができた。ホモ乳酸発酵を行い、酢酸耐性を示す⁸⁾*L. acetotolerans* が優占種となっている群(16サンプル)と、ヘテロ乳酸発酵を行い、同じく乳酸耐性を示す⁴⁾*L. buchneri* が優占種となっている群(6サンプル)がみられた。その他の乳酸菌が優占種となる群(3サンプル)では *Lactiplantibacillus* 属や *Lactobacillus acidipiscis* といった乳酸菌が優占種であったが、それぞれ漬物のような植物性の発酵食品やタイの水産加工食品⁹⁾から分離例が報告されており、米と鮎を原料として作られる鮎寿司から分離される乳酸菌種として妥当であると考えられた。また、すべての鮎寿司から検出された *Lactobacillus* 属の乳酸菌は *Isobe* ら²⁾や *Tsuda* ら³⁾の報告にある乳酸菌種であった。このことから、サンプル入手条件が異なっても、鮎寿司の乳酸菌種の多様性は低く、一定の範囲の菌種に限られていると推測された。また、今回の検討では、鯖寿司や鮎寿司といった他のナレズシで優占種として報告のある *L. plantarum* や *L. sakei*^{5) 6)}などはほとんど検出されなかった。鯖寿司や鮎寿司は2週間から1か月程度で発酵が完了するのに対して、鮎寿司は数か月の発酵期間を必要とする。鮎寿司製造においては、他のなれずしとは異なる魚種および長期間の発酵期間によって鮎寿司独自の優占種が形成されると考えられた。

購入した鮎寿司を製造場所でプロットすると、彦根市や長浜市といった湖北地域で *L. acetotolerans* 優占種となるサンプルが多い傾向にあった。一方で、近江八幡市では、全てのサンプルが *L. buchneri* 優占種とな

っていた。過去に Tanabe ら⁴⁾が、主に近江八幡市や近隣の東近江市で製造された鮎寿司から乳酸菌を分離した結果においても、*L. buchneri* しか検出されなかったことから、これが一時的なものではなく長期的に、同地域の市販の鮎寿司において、優占種となっていると考えられた。また、*L. buchneri* 優占種群の製造地は、*L. acetotolerans* 優占種群の製造地よりも緯度において有意に低い値を示した。彦根（北部）の日最高気温は大津（南部）の日最高気温よりも年間を通して 0.5~1℃低い¹⁰⁾。わずかな気温差ではあるが、6 か月にわたる長期間の鮎寿司の発酵過程においては、発酵の活性化及び優占種の決定過程に影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの結果より、鮎寿司の発酵に関わる乳酸菌は製造地域によって明確に異なる可能性が示唆された。しかし、乳酸菌種を決定する直接的な要因については、原料とする鮎や米、製造方法の調査が十分できなかったため、今後の検討課題である。今後、近江八幡市と他の市町村について、鮎寿司製造方法や水・植物などの自然環境中の乳酸菌種などの違いを詳細に調査する必要がある。

鮎寿司には主に乳酸や酢酸などの有機酸が含まれており、香りや嗜好性を決定する要因と考えられている¹¹⁾¹²⁾。本研究では、乳酸のみを産生するホモ乳酸菌である *L. acetotolerans* が優占種となっている群では乳酸が多く飯に含まれており、乳酸以外の有機酸等も産生するヘテロ乳酸菌である *L. buchneri* が優占種となっている群では酢酸が多く飯に含まれていた。これは、優占種となっている乳酸菌種が、有機酸の量に影響を及ぼす可能性を示している。有機酸を含む食品において、乳酸はさわやかな酸味となり、酢酸は食酢様臭があり、さわやかさが減弱する¹³⁾と言われている。そのため、乳酸や酢酸の量や割合が異なることが、香りや風味に違いを生じさせる原因と示唆される。

飯漬け前の炊いた米にカリウムは 29 mg/100 g 含まれていたと推測される¹⁴⁾。一方、製品となった鮎寿司の飯懸濁液において、*L. acetotolerans* 優占種群では 79 mg/100 g、*L. buchneri* 優占種群では 61 mg/100 g と、一般的な飯の約 2 倍のカリウムが含まれていた。鮎寿司の原料には多く

のカリウムが含まれており、特に主原料である鮎には 340 mg / 100 g のカリウムが含まれている。一方で鮎寿司の魚体に含まれているカリウムは 64 mg / 100 g となっている。これは、鮎寿司の発酵過程において、魚体からカリウムが飯に溶出する可能性を示唆している。さらに、塩切りの工程では大量の塩を使用するために安く精製度が低くカリウムを多く含む塩を用いる可能性がある。このように、飯に含まれるカリウムには原料由来のカリウムが影響していると推測される。鮎寿司は一般的にほとんど捨てるところがなく、骨まで一緒に食することとなるため、骨の固さが鮎寿司の食べやすさにつながると考えられる。特に、魚体最深部に位置する背骨の骨硬度は、発酵が十分に進行し、産生された有機酸の魚体内部への浸透を評価するために活用できると考えた。これまで鮎寿司の物理的な特性を調べた報告はなく、本研究での骨硬度測定は、鮎寿司の食感（テクスチャー）を数値化した初めての例となる。骨硬度の上位中位下位のサンプル群間で、元素分析、有機酸分析において有意な差は見られなかったが、骨硬度と有機酸の含有量については負の相関があることが見えてきた。また、Fujii らの報告¹⁾では、飯の乳酸、酢酸含有量がそれぞれ 0.49%、0.18%であり、本研究の測定結果の方が高値であった。近年、酸味の強すぎる鮎寿司が敬遠される傾向にあり、発酵期間を短縮させる、あるいは重石を増加させて発酵を抑制させる工夫がなされている。消費者にあわせた製造方法の変化が、飯に含まれる有機酸量の低下の原因となる可能性が示唆される。一方、なれずし中の酢酸と乳酸の割合は 9:1 であるとする報告¹⁵⁾があり、本研究でも同様な傾向となった。本研究で調べた鮎寿司の、酢酸と乳酸の割合については一般的ななれずしと同様であると考えられた。

鮎寿司は製造工程により風味や味が異なると言われている¹⁶⁾。特に飯漬け中に水を張ることは、桶中の脱気を促進し、嫌気環境の形成に有効であると考えられる。さらに発酵に関与しない雑菌の増殖を防ぐことが期待される¹⁷⁾ため、*Lactobacillus* 属の優占種を決定する一つの要因である可能性が示唆される。しかし本研究では、水を張る張らないに関わらず、ミネラル量、有機酸

量には顕著な差は認められず、*Lactobacillus* 属の優占種群についても一定の多様性が観察された。本研究における鮎寿司製造方法に関する聞き取り調査では、成分分析との関連を解析するためには、十分ではなかった可能性がある。

5. 要約

滋賀県内で市販されている鮎寿司においては、*Lactobacillus* 属の乳酸菌が優占種であり、特に *L. acetotolerans*, *L. buchneri* が優占種となるサンプルが大半を占めた。さらに近江八幡市で製造されたすべての鮎寿司において *L. buchneri* が優占種であったことから、鮎寿司の乳酸菌優占種は製造地域によって明確に異なる可能性が示された。また、乳酸菌優占種によって、酢酸や乳酸といった有機酸の産生量が異なることから、優占種の違いが、鮎寿司の味や風味に影響を及ぼす可能性が示された。

6. 謝辞

本研究は、サントリー文化財団 2022 年度研究助成「学問の未来を拓く」「ナレズシはいかに「洗練化」したのかー乳酸菌分析にもとづく環境史へのアプローチ」(研究代表者：橋本道範、2022 年 8 月～2023 年 7 月)の助成によって実施されました。また、本研究の遂行にあたり、聞き取り調査にご協力して下さった滋賀県内の鮎寿司製造者の皆様に心から感謝致します。

利益相反 (COI) に関して開示すべきものはありません。

7. 参考文献

- 1) Tateo Fujii, Tatsuo Sasaki, and Masayo Okuzumi: Chemical composition and microbial flora of Saba-narezushi (Fermented Mackerel with Rice), *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 891-894 (1992)
- 2) Yuka Isobe, Tsunami Mizuhashi, and Miyo Narita: Microbial flora of Funazushi (Pickled Crucian Carp), *Journal of Home Economics of Japan*, **53**, 61-64 (2002)
- 3) Harutoshi Tsuda, Kenzo Kubota, Teruki Matsumoto, and Yoshiko Ishimi: Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional fermented sushi, Funazushi, from Japan, *Food Science and Technology Research*, **18**, 77-82 (2012)
- 4) Koichi Tanabe, Masaki Monguchi, Ryoga Inoue, Rio Zamami, Ryo Nakanishi, Ayano Manabe, Kaho Oe, Noriko Komatsuzaki, and Jun Shima: *Lentilactobacillus buchneri* domination during the fermentation of Japanese traditional fermented fish (funazushi), *Food Science & Nutrition*, **10**, 4073-4079 (2022)
- 5) Ryohei Doi, Yunga Wu, Yusuke Kawai, Lun Wang, Takeshi Zendo, Kohei Nakamura, Tohru Suzuki, Masaya Shimada, Takashi Hayakawa and Tomoyuki Nakagawa: Transition and regulation mechanism of bacterial biota in Kishu saba-narezushi (mackerel narezushi) during its fermentation step, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **132**, 606-612 (2021)
- 6) Mitsuyo Hori, Yusuke Kawai, Kohei Nakamura, Masaya Shimada, Hitoshi Iwahashi, and Tomoyuki Nakagawa: Characterization of the bacterial community structure in traditional Gifu ayunarezushi (fermented sweetfish), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **134**, 6331-337 (2022)
- 7) Mariko Manabe, Nahoko Umeda, Yuka Isobe, and Kaori Kubo: Effects on preferability of the experience in tasting funazushi and information about the food, *Journal of Home Economics of Japan*, **63**, 737-744 (2012)
- 8) Etsuzo Entani, Hiroshi Masai, and Ken-ichiro Suzuki: *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth, *Systematic and Evolutionary Microbiology*, **36**, 544-549 (1986)
- 9) Somboon Tanasupawat, Osamu Shida, Sanae Okada, and Kazuo Komagata: *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand, *Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 1479-1485 (2000)
- 10) 気象庁・過去の気象データ (<https://www.jma.go.jp/jma/index.html>)
- 11) Masako Horikoshi: Fermentation culture of fresh water fish, *Journal of the Brewing Society of Japan*, **107**, 389-394 (2012)
- 12) Kaori Mukai-Kubo, Kyohei Nishi, Masako Horikoshi: Flavor and smell of fermented sushi, *Journal of Japan Association on Odor Environment*, **38**, 173-178 (2007)
- 13) Yoshimi Shimazu, Masao Fujiwara, Masazumi Watanabe, Yuichiro Ota: Effect of drinking temperature on the acidity of organic acids in "Sake", *Journal of cookery science of Japan*, **42**, 327-333 (2009)
- 14) 医歯薬出版編：日本食品成分表 2023 八訂, pp12-13(2023)医歯薬出版株式会社, 東京
- 15) Takashi Koyanagi, Akira Nakagawa, Masashi Kiyohara, Hiroshi Matsui, Keiko Yamamoto, Florin Barla, Harumi Take, Yoko Katsuyama, Atsushi Tsuji, Masahisa Shijimaya, Shizuo Nakamura, Hiromichi Minami, Toshiki Enomoto, Takane Katayama, and Hidehiko Kumagai: Pyrosequencing analysis of microbiota in Kaburazushi, a traditional medieval sushi in Japan, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**, 2125-2130 (2013)
- 16) 滋賀の食文化研究会編：ふなずしの謎 新装版, pp135-139 (2011), サンライズ出版, 滋賀
- 17) 橋本道範編著：再考 ふなずしの歴史, pp280-282(2017)サンライズ出版, 滋賀

Article

Analysis of microbial flora and chemical compositions in the commercial funazushi

Takashi Shiota¹, Yoko Yoshiyama², Miho Goto², Sayaka Kato², Saki Sato², Iku Shioiritani², Jun Shima^{2,3}, Koichi Tanabe^{*2,3}, Michinori Hashimoto⁴

¹Graduate School of Agriculture, Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

²Faculty of Agriculture, Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

³Ryukoku University Microbial Resource Center for Fermentation and Brewing, 1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

⁴Lake Biwa Museum, 1091 Oroshimo, Kusatsu, Shiga 525-0001, Japan

* Corresponding author: E-mail: ktanabe@agr.ryukoku.ac.jp

Received March 22, 2024; Accepted April 17, 2024

Abstract

Funazushi is a traditional fermented fish made with boiled rice that has been produced in Shiga Prefecture since ancient times. However, there is limited information on components such as microbial flora and organic acids that contribute to the fermentation of funazushi, and few studies that have comprehensively investigated multiple samples had been performed. In this study, we purchased 27 of commercially available funazushi in Shiga Prefecture and conducted interviews with the manufacturers. We also performed the measurements of bone stiffness, microbial analysis, elemental analysis, and organic acid analysis of the funazushi samples. Analysis of microbial flora in the funazushi samples with next-generation sequencer revealed that the funazushi samples mainly contained lactic acid bacteria which belong to *Lactobacillus*, and *Lactobacillus acetotolerans* and *Lentilactobacillus buchneri* were the major dominant species in most samples. In addition, *L. buchneri* was the dominant species in all funazushi produced in Omi-hachiman City. Samples of the *L. acetotolerans*-dominant group contained more lactic acid than those of *L. buchneri*-dominant group, whereas the former group samples had lower potassium and acetate concentrations than the latter group samples. These results suggest that the microbial flora contained in commercially sold funazushi in Shiga Prefecture has been determined by the manufacturing region, and that the dominant lactic acid bacterial species affect the content of elements and organic acids in funazushi.

Keywords: Funazushi, lactic acid bacteria, fermented food, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lentilactobacillus buchneri*

(責任編集委員：上野義栄)