

醃酵漬物における亜硝酸の
生成と制御に関する研究

1995

岩手大学大学院
連合農学研究科
宮尾茂雄

①

醗酵漬物における亜硝酸の 生成と制御に関する研究

1 9 9 5

岩 手 大 学 大 学 院
連 合 農 学 研 究 科
宮 尾 茂 雄

目 次

第 1 章	緒 論	1
第 2 章	醱酵漬物における亜硝酸生成細菌 の選択的計数法の確立	10
	第 1 節 方 法	11
	第 2 節 結果及び考察	15
	第 3 節 要 約	22
第 3 章	醱酵漬物中の各種乳酸菌群の選択的 計数法の確立	23
	第 1 節 方 法	25
	第 2 節 結果及び考察	31
	第 3 節 要 約	46
第 4 章	正常な醱酵漬物における微生物 及び化学的变化	48
	第 1 節 方 法	48
	第 2 節 結果及び考察	52
	第 3 節 要 約	61
第 5 章	醱酵漬物における亜硝酸の蓄積 と異常醱酵	63
	第 1 節 方 法	63
	第 2 節 結果及び考察	68
	第 3 節 要 約	80

第6章	亜硝酸の醗酵漬物由来細菌に対する	
	死滅促進効果	81
	第1節 方法	81
	第2節 結果及び考察	85
	第3節 要約	95
第7章	醗酵漬物由来細菌の亜硝酸生成	
	におよぼす製造環境要因の影響	96
	第1節 方法	97
	第2節 結果及び考察	99
	第3節 要約	111
第8章	温和加熱を利用した漬物の醗酵制御	113
	第1節 方法	114
	第2節 結果及び考察	116
	第3節 要約	126
第9章	アリルイソチオシアネートによる	
	漬物の醗酵制御	128
	第1節 方法	129
	第2節 結果及び考察	134
	第3節 要約	147
第10章	総括	148
要 訳		157
謝 辞		161
引用文献		162

第 1 章

緒 論

近年における我が国での漬物生産量の傾向をみると、消費者の健康志向、高鮮度食品志向を反映したものとなっている。すなわち、味噌漬など食塩濃度の高い漬物の生産量は変化が無いかあるいは減少する傾向が認められるが、浅漬に代表される低塩で原料野菜の風味を生かした漬物の生産量は急速に増加しており、全漬物生産量の約1/3を占めるに至っている¹⁾。また、漬物の付加価値を高める目的から自然の風味を生かそうとする傾向がみられ、漬物の調味液に醗酵成分を添加したものも増加している。このような背景のもとで、醗酵漬物に対する関心は以前にも増して高まっており、品質の良い醗酵漬物を安定的に製造する技術の確立が望まれている。

醗酵漬物は世界各地にあり、それぞれの地域の特性に合わせた製造法により作られている。醗酵漬物の製造に関与している微生物の挙動や品質に関しては、わが国では糠漬^{2)~14)}、すぐき漬¹⁵⁾、すんき漬^{16)~24)}、カブ漬²⁵⁾、国外ではサワークラウト²⁶⁾、醗酵ピクルス^{27)~34)}、キムチ^{35)~37)}、グンドルック³⁸⁾などを対象にした報告例があり、漬物の製造に際し、各種乳酸菌が品質や風味に大きな影響をおよぼしていることが報告されている。

このような報告のうち、詳細な研究が行なわれたサワークラウトおよび醗酵ピクルスなどを例に、醗酵漬物に関する微生物学的研究の歴史について概要を述べる。

サワークラウトに関する研究は、国内での関心があまり高くないことから、国内での報告例はほとんど無く、多くは国外である。

サワークラウトとは酸っぱい (Sauer) 野菜 (Kraut) という意味であるが、細刻したキャベツを2~3%の食塩のもとで、乳酸醗酵を行なわせ、酸と特有の風味を付与させたものである。生産地はドイツを中心としたヨーロッパで、国内においても一部で製造されている。

サワークラウトの醗酵に関する微生物学的研究を最初に行なったのはConrad³⁹⁾と考えられている。報告の中で、主要細菌としてグラム陰性細菌で運動性を有する細菌を観察し、"*Bacterium brassicae acidae*"と命名している。また、ほぼ同時期にButjagenはサワークラウトからmicrococci、グラム陰性桿菌、グラム陽性桿菌を分離し、micrococciは醗酵初期に消滅し、グラム陰性桿菌は6日目までは存在していたが、グラム陽性桿菌の増殖にともない、減少したことや醗酵の後半になると酵母が出現したことを報告している。したがって、Butjagenの報告⁴⁰⁾は現在考えられているサワークラウトにおける微生物叢変化の内容とほぼ同じものになっている。1930年に至り、Pedersonは「サワークラウ

トの醗酵におけるフローラ変化」をまとめ、詳細な研究成果を報告している²⁶⁾。報告によるとサワークラウトから分離された細菌をまとめたところ、主要菌は*Leuconostoc mesenteroides*、"*Lactobacillus pentoaceticus*"(現在は*Lact.brevis*に分類されている)、"*Lact.cucumeris*"(現在は*Lact.plantarum*に分類されている)および*Lact.plantarum*であることを明らかにするとともに、醗酵初期の主要菌は*Leuconostoc*属菌で、後半は*Lactobacillus*属菌であることが醗酵を行なう上で重要であることを報告している。

醗酵ピクルスはサワークラウトと同様、低塩下で乳酸醗酵を行なわせ、風味を熟成させるもので、強い酸味を特徴としている。醗酵ピクルスに関する研究のほとんどは欧米が中心であり、PedersonやEtchellsらの功績に負うところが多い。PedersonとWardはピクルスの醗酵における細菌叢と化学成分の変化についての詳細な研究結果を報告²⁸⁾している。この中で、乳酸醗酵に関わる細菌として、*Leuc.mesenteroides*、*Enterococcus faecalis*、*Pediococcus damnosus*、*Lact.plantarum*、*Lact.brevis*を主要な細菌として分離している。近年に至り、NoutとRomboutsは野菜発酵食品の総説⁴¹⁾のなかで、野菜の自然発酵について言及し、*Enterococcus faecium*、*Enterococcus faecalis*、*Lact.acidophilus*、*Lact.lactis*、*Lact.plan*

tarum、*Lact. brevis*、*Ped. acidilactici*、*Ped. damnosus*、*Ped. pentosaceus*などを主要な乳酸菌として紹介している。また、Stamerは低食塩下での発酵においては*Leuc. mesenteroides*がしばしば発酵初期の段階で主要菌となることを報告⁴²⁾している。野菜の醗酵において、乳酸菌が生成するバクテリオシンの微生物叢への影響についても多く報告されている。Flemingらはキュウリの醗酵に關与する*Lact. plantarum*の増殖を阻害する*Pediococcus*属菌を分離し、その阻害がバクテリオシンによるものであることを報告⁴³⁾している。

国内の醗酵漬物における微生物の挙動に関しては糠漬^{2~14)}、すぐき漬¹⁵⁾、赤カブ漬²⁵⁾やすんき漬^{16~24)}に關する報告がある。すぐき漬は京都の北、上賀茂地方で作られている醗酵漬物で、古い歴史をもっている。原料として使用されているすぐき菜の記事が「日次紀事」(黒川道裕(1685))の中で既に述べられていることから、すぐき漬は今から300年以上も前から存在していたことが推定される。

すぐき漬は「室漬け」と呼ばれる世界にも例のない「温醸」によって醗酵を行なうところに特徴がある。すなわち、「室」と呼ばれる保温のための小さな部屋に「本漬」を終えた樽を入れ、電熱器などを用いて「室」の温度を35℃前後に保たせ、醗酵を行なうものである。

すぐき漬の微生物に関する研究は、中沢が詳細に行ない、すぐき漬の「本漬」工程からは *Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Lactobacillus* 属菌を分離、同定している。なお、この中で、最も優勢であったのは *Lact. plantarum* で、乳酸菌の添加による製造も試みている¹⁵⁾。

また、赤カブ漬に関しては、微生物および有機酸の変化について円谷らの報告²⁵⁾がある。赤カブ漬は岐阜県飛騨高山地方の名産で、秋頃に収穫した赤カブを葉の付いた状態で低濃度の食塩に漬け、醗酵させたものである。微生物の変化については菌叢まで調べてはいないが、醗酵初期と後期に乳酸菌の増加がみられている。また、非産膜性酵母、好気性細菌は醗酵初期において減少することを観察している。

以上、サワークラウト、発酵ピクルス、すぐき漬、赤カブ漬を例に、微生物の観点から今までの研究成果についてその概要を述べてきたが、それらの研究結果により、醗酵漬物における正常な醗酵は一般的に以下に示す経過をたどることが明らかにされてきた。

すなわち、醗酵の初期は、原料野菜に付着しているグラム陰性細菌や *Micrococcus* 属菌などの増殖が見られるのが一般的であり、その後、球状乳酸菌の *Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 属菌が増殖し、乳酸が生成されると酸に対する抵抗性の弱い初期の細菌

は徐々に減少し、死滅するようになる。球状乳酸菌の増殖が見られた後は、桿状乳酸菌の *Lactobacillus* 属菌が増殖し、それにとまなう乳酸の生成により、pHはさらに低下するようになる。その結果、酸に対する抵抗性が桿状乳酸菌より小さい球状乳酸菌は減少し、*Lactobacillus* 属菌が優勢となってくるのが、醗酵漬物の正常な醗酵経過における微生物的变化である。

一方、醗酵漬物の異常醗酵や変敗に関する研究報告あるいはそれらの対策についても報告されているが、それらのほとんどは製品の軟化および膨張に関するものである。

Bellらは醗酵ピクルスの軟化の原因について検討を行った結果、それらがポリガラクチュロナーゼのようなペクチン分解酵素を有する微生物の増殖によるものであることを指摘し、塩蔵キュウリからポリガラクチュロナーゼを有する酵母を分離している²⁹⁾。Hamiltonは塩蔵水よりペクチン分解酵素を有する微生物の検索を行ない、ある種の糸状菌が軟化の原因であることを報告している³⁰⁾。このように、軟化の原因は糸状菌によるものが多く、その代表的なものは *Penicillium*、*Fusarium*、*Alternaria*、*Cladosporium* 属菌である。それらの糸状菌はペクチン分解酵素を生成するので、ピクルスの組織細胞を分解し、軟化させる。

つぎは醗酵漬物の膨張に関する報告である。その原因

についてPedersonらはガスを産生する発酵性酵母や細菌がキュウリの維管束を通して侵入し、それらが増殖し、活動することに起因すると報告³¹⁾している。このようにキュウリの内部に発酵性酵母の*Torulopsis*、*Saccharomyces*属酵母や*Lact. brevis*のようなガス産生性の乳酸菌が侵入することによって生じることが明らかにされている。以上、述べてきたように、醗酵漬物の変敗について検討が加えられた報告の多くは軟化あるいは膨張に関するものである。

一方、醗酵漬物を製造する際、正常な醗酵が進行せず、pHの低下が遅延し、色調の低下や異臭の発生など、品質的に劣る製品が出現することが知られている。この原因としては原料野菜の成分、微生物、醗酵温度、食塩濃度など多くの要因が考えられる。著者は醗酵漬物の異常醗酵について様々な観点から検討を加えてきたところ、醗酵が正常に進行しなかった漬物の中に、かなりの量の亜硝酸が蓄積していることを見出した。一般的に、漬物の醗酵においては、醗酵経過に従い、原料野菜中の硝酸塩が還元されて亜硝酸が生成されるが、さらに醗酵が進行すると乳酸醗酵にともなうpHの低下により亜硝酸は分解され、消失していくのが普通である。しかし、上述したように、醗酵漬物中に生成される亜硝酸が醗酵や漬物の品質に影響を与えていることに関しては過去においてはほとんど研究されておらず、その原因を明らかに

し、対応策について検討を行なうことは醗酵漬物を製造する上で大変意義のあるものと考えられる。

本研究は、漬物の醗酵に及ぼす亜硝酸の影響を明らかにし、良質な醗酵漬物を製造するための微生物制御技術を確立することを目的として、以下のような課題について検討を進めた。

1. 醗酵漬物における亜硝酸生成細菌の選択的計数法を確立する。
2. 醗酵漬物における各種乳酸菌の分別計数法を確立する。
3. 醗酵漬物における亜硝酸の蓄積が醗酵に関与する微生物にどのような影響を及ぼし、異常発酵を起こすのかについて明らかにする。
4. 醗酵漬物由来細菌の亜硝酸生成におよぼす製造環境要因の影響を明らかにする。
5. 温和加熱を利用した漬物の醗酵制御法について検討を行なう。
6. 野菜の主要な辛味成分であるアリルイソチオシアネートを利用した漬物の醗酵制御法の検討を行なう。

本論文は、次のような内容で構成した。まず、第2章で、亜硝酸生成細菌の選択的計数法の確立について、第3章では、漬物の発酵に関与する各乳酸菌群の分別計数法の確立について述べた。第4章では、正常な醗酵漬物における微生物及び化学的变化について述べ、第5章では醗酵漬物における亜硝酸の蓄積と醗酵異常について述べた。第6章では、醗酵漬物由来細菌の死滅に及ぼす亜硝酸の影響について述べ、第7章では、醗酵漬物を製造する際の環境要因が亜硝酸の生成に及ぼす影響について述べた。第8章では、温和加熱処理が醗酵に関与する微生物に対する影響について述べ、第9章では、アリルイソチオシアネートを利用した醗酵制御法について述べた。

第 2 章

醗酵漬物における亜硝酸生成細菌の
選択的計数法の確立

本研究を遂行するにあたっては、醗酵漬物における亜硝酸の生成に深く関与している亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）の質的、量的な変化を調べることが必要であることから、亜硝酸生成細菌の選択的計数法の確立を目的に以下の試験を行なった。

野菜に付着している亜硝酸生成細菌の作用によって、野菜に含まれている硝酸塩が還元され、漬物中に亜硝酸が蓄積されることが知られている。Hallらはニンジンから分離した亜硝酸生成細菌をニンジンジュースに接種すると亜硝酸が生成、蓄積することを報告している⁴⁴⁾。柳原らは漬物に蓄積する亜硝酸は漬物の中に存在する亜硝酸生成細菌の作用に起因すると報告している⁴⁵⁾。

亜硝酸生成細菌の計数に関してはMPN法⁴⁶⁾を用いるのが一般的であるが、MPN法は操作が煩雑であるとともに亜硝酸生成細菌を選択分離するのが困難である。そこで、本章においては漬物に関連の深い亜硝酸生成細菌の計数と分離が容易に行なえる新しい方法としてSAN(Sulfanilamide Nitrate)寒天重層法を確立する目的から検討を加えた。

第1節 方 法

1. 使用菌株

実験に使用した17菌株 (Table 2) は当研究室で保存しているものを用いた。なお、そのうちの7株は漬物原料野菜および醗酵漬物より、分離、同定したものである。供試菌株の前培養は培地として、ペプトン (日水製薬) 5 g、酵母エキス (大五栄養化学) 2.5 g、グルコース 1 g を蒸留水 1 l に溶解し、滅菌したものを用い、30℃で24～48時間培養した。

2. 供試野菜

実験に使用した野菜は、キャベツ、白菜、大根、キュウリで東京都農業試験場で栽培されたものを用いた。

3. 試験管法による亜硝酸生成試験 (硝酸還元試験)

供試菌株をそれぞれ試験管を用い、硝酸塩培地 (KNO_3 1 g, トリプチケースペプトン (BBL) 0.5 g, 酵母エキス (大五栄養化学) 0.25 g、グルコース / 蒸留水 1 l) で3～5日間培養後、亜硝酸の生成を調べるために、それぞれの試験管に0.8% スルファニル酸 / 5N 酢酸および0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン ジハイドロクロラ

イド溶液を数滴ずつ加え、亜硝酸の生成の有無をみた⁴⁷⁾。そして、深紅色を呈したものを亜硝酸生成陽性とした。なお、陰性のものについては亜鉛粉末を加え、未反応の硝酸塩を還元させることにより確認した。なお、本法を試験管法と称することとした。

4. SAN寒天重層法による亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）の計数および分離

供試原料野菜は細切後、10gを90mlの滅菌蒸留水の入ったホモジナイズ用カップに採取し、ホモジナイズし、検液を調製した。検液は滅菌蒸留水を用いて、10倍段階希釈を行ない、その希釈液の0.1mlを標準寒天培地（栄研化学）の表面にコンラージガラス棒で均一に塗布した。塗布後の培地は30℃で2～3日間培養後、コロニーの発生した培地上に固化直前まで冷やした約15mlのSAN寒天を静かに重層した。寒天が固化してから30℃で約15分間静置後、0.1% NEDA (N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride) / 2N塩酸（和光純薬）を培地表面に約1ml注加し、亜硝酸の生成によりコロニーおよびコロニーの周辺部が赤変したものを計数し、亜硝酸生成細菌数（硝酸還元細菌数）とした。亜硝酸生成細菌の分離に当たってはSAN寒天重層法とレプリカ法を併用して行なった。すなわち、標準寒天培地上のコロニーをSAN寒天の重層の前にレプリカ法によって

転写、培養し、SAN寒天重層法によって明らかとなった亜硝酸生成細菌のコロニーの位置と対応させ、比較することによって釣菌を行なった。SAN寒天の組成についてはTable 1に、SAN寒天重層法についてはFig. 1に示した。

なお、生菌数、グラム陽性細菌数、グラム陰性細菌数の測定は以下の方法によった。

すなわち、生菌数は標準寒天培地（栄研化学）を用いた混釈平板培養法により、30℃、3日間培養後、生成したコロニーを計数することにより求めた。グラム陽性細菌数は2・フェニルエチルアルコールを0.25%となるよう標準寒天培地に加えたものを使用し、混釈平板培養法により30℃、3日間培養後、出現コロニー数を計数することで求めた。また、グラム陰性細菌数はCVT寒天培地（日水製薬）を用い、表面塗抹法により行ない、30℃、3日間培養後、出現した赤色コロニーを計数することによって求めた。

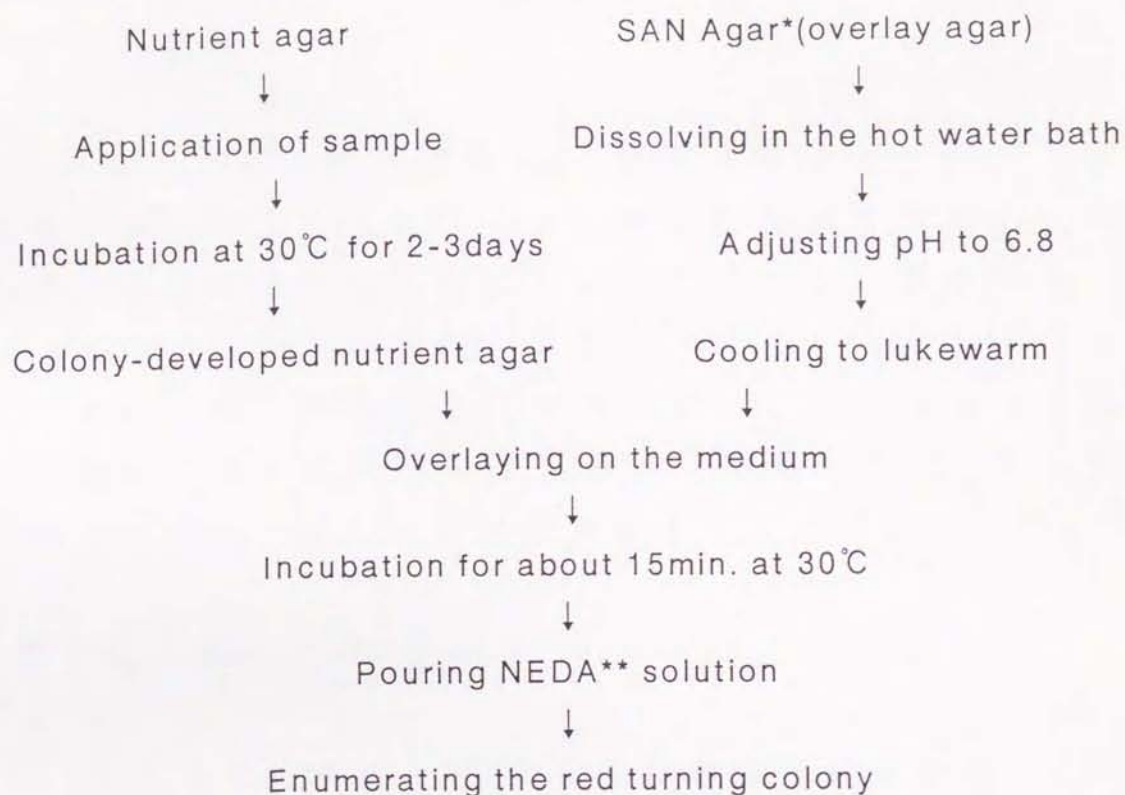


Fig. 1. SAN Agar overlay method for the enumeration of nitrite producing bacteria

*: Sulfanilamide nitrate agar

** : N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride

Table 1. Composition of SAN agar and NEDA solution for the SAN agar overlay method

SAN agar		NEDA solution	
Glucose	0.5 g	NEDA*	0.1 g
KNO ₃	1.0 g	2N HCl	100 ml
Sulfanilamide	0.2 g		
Agar	2.0 g		
Water	100 ml		

*: N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride

5. 分離菌株の同定

キャベツ及び白菜からSAN寒天重層法とレプリカ法を組み合わせてることによって分離した菌株はコロニーの形態、グラム染色性、形状により大まかな分類を行なった。さらに、芽胞の有無、運動性、カタラーゼ、オキシダーゼの有無、嫌気条件下での生育、グルコースの酸化及び醗酵について調べ、その結果を成書⁴⁸⁻⁵⁰⁾と比較することにより属レベルでの分類を行なった。

第2節 結果及び考察

1. 保存菌株に対するSAN寒天重層法と試験管法による亜硝酸生成(硝酸還元)試験の比較

漬物に関連の深い保存菌株17株を対象に、コロニー数が標準寒天培地上に30~100個形成するように前培養液を希釈し、培地上に各0.1mlを塗抹した後、培養し、SAN寒天重層法による亜硝酸生成試験(硝酸還元試験)の有効性について検討を加えた。試験管法による亜硝酸生成試験は常法どおり硝酸塩培地で培養後、亜硝酸の生成を調べたが、その結果はTable 2に示した。*Micrococcus luteus*の1株がSAN寒天重層法で陰性、試験管法で陽性となり一致せず、また、*Pseudomonas* sp. はSAN寒天重層法で陰性、試験管法で弱い陽性となり一致しなかったが、その他の菌株においては全て一致したことからSAN寒天重層法による亜硝酸生成試験はかなり有効であり、かつ簡便にできることがわかった。

Table 2. Comparison of SAN agar and broth test for the nitrate-reduction test against named strains

Strains	SAN agar	Broth*
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	-	+
<i>Micrococcus varians</i> GP-1	+	+
Coryneform bacteria GP-4	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 209JC1	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. GP-7	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC9135	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C24	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. T096	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. T045	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> E-1	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3301	+	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> IFO 3380	+	+
<i>Xanthomonas</i> sp. IFO 3084	+	+

+: nitrite producing positive —: nitrite producing negative

*: Put a few drops of 2% sulfanilamide/85% phosphoric acid and 0.5% NEDA solution in each broth culture to be tested.

A distinct pink or red in the broth indicates the presence of nitrate.

2. 野菜分離菌株に対するSAN寒天重層法と試験

管法（従来法）による亜硝酸生成（硝酸還元）試験の比較

3個のキャベツおよび2個のカブからそれぞれ標準寒天培地を用いて250の菌株を分離し、それぞれの菌株に対してSAN寒天重層法と試験管法による硝酸還元試験を実施し、比較検討した結果をTable 3に示した。硝酸還元試験において両方法が一致した比率は96.4%で非常に高い一致率を示した。逆に、不一致率は3.6%にとどまった。したがって、この結果からSAN寒天重層法は硝酸還元試験として簡便で有効な方法であることを認めた。

Table 3. Comparison of SAN agar and broth test for detection of nitrate-reducing bacteria isolated from cabbages and turnips

Nitrate reduction test		Number of strains which gave identical reaction with two methods				
SAN agar	Broth	Cabbage			Turnip	
		1	2	3	1	2
+	+	10	19	5	3	12
—	—	40	31	39	46	36
+	—	0	0	0	0	0
—	+	0	0	6	1	2

+: Positive reaction —: Negative reaction

3. SAN寒天重層法による漬物原料野菜の亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）の計数

SAN寒天重層法が硝酸還元試験を簡便に行うのに有効であることを明らかにしたが、それを実際に亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）の選択的計数に用いた例をFig. 2及びFig. 3に示した。Fig. 2は生菌数の測定を終了した培地で、SAN寒天を重層する前の状態を示している。Fig. 3はSAN寒天を重層し、定温恒温器で一定時間静置後、硝酸塩を還元し、亜硝酸を生成した細菌のコロニー及び周辺部が赤変している状態を示している。したがって、赤変コロニー数を計数することにより、亜硝酸生成細菌数を測定することを可能とした。



Fig. 2 Before pouring SAN agar



Fig. 3 After pouring SAN agar

つぎに、SAN寒天重層法を用いて、漬物原料野菜であるキャベツ、白菜、キュウリ、カブを対象に亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）数の測定に応用した結果をTable 4に示した。細菌数はいずれも3個の平均値で表した。生菌数はいずれの野菜においても約 $10^5 \sim 10^6 / g$ 、グラム陽性細菌数は約 $10^4 \sim 10^6 / g$ 、グラム陰性細菌数は約 $10^5 \sim 10^6 / g$ に達していた。また、亜硝酸生成細菌数は約 $10^4 \sim 10^6 / g$ に達していた。グラム陽性細菌のうち、亜硝酸生成細菌が占める割合は $1 / 10^2 \sim 1 / 10$ と低い値であったが、グラム陰性細菌の場合は亜硝酸生成細菌が占める割合は約 $1 / 2$ に達していた。したがって、野菜に付着しているグラム陰性細菌の多くが硝酸還元能を有し、亜硝酸を生成することが明らかとなった。

Table 4. Number of nitrite producing bacteria in cabbage, chinese cabbage, cucumber and turnip

bacteria	cabbage	chinese cabbage	cucumber	turnip
Gram-positive bacteria	$2.5 \times 10^4 / g$	$4.0 \times 10^5 / g$	$4.0 \times 10^6 / g$	$3.2 \times 10^5 / g$
Nitrite producing bacteria	$3.0 \times 10^3 / g$	$8.0 \times 10^3 / g$	$2.1 \times 10^5 / g$	$4.3 \times 10^3 / g$
Gram-negative bacteria	$7.6 \times 10^5 / g$	$6.2 \times 10^6 / g$	$1.3 \times 10^6 / g$	$1.2 \times 10^5 / g$
Nitrite producing bacteria	$3.9 \times 10^5 / g$	$4.8 \times 10^6 / g$	$4.0 \times 10^5 / g$	$5.9 \times 10^4 / g$

4. 漬物原料野菜の亜硝酸生成細菌の細菌叢

キャベツ及び白菜からSAN寒天重層法とレプリカ法を組み合わせることによって分離したそれぞれ61、56の菌株に対して属レベルでの同定を行ない、グラム染色性、形状、芽胞の有無、運動性、カタラーゼ及びオキシダーゼの有無、グルコースのOFテスト、糖の分解性等の結果から、Table 5に示す結果を得た。キャベツの場合、グラム陽性細菌では芽胞の存在の認められた好気性細菌の*Bacillus*、形状が球状でカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性の好気性細菌である*Micrococcus*属菌及び形状が球状でカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性でグルコースを醗酵的に利用する通性嫌気生菌である*Staphylococcus*属菌が分離され、なかでも*Bacillus*と*Micrococcus*属菌が多く見られた。グラム陰性細菌においては形状が桿菌でカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、グルコースを醗酵的に利用する通性嫌気性細菌であるEnterobacteriaceaeに属する細菌が亜硝酸生成細菌として一般的であった。なかでも特に*Enterobacter*属菌が多く分離された。その他のものとしては運動性を有する桿菌でカタラーゼ、オキシダーゼ共に陽性、グルコースを酸化的に利用する特徴を有する*Pseudomonas*属菌や*Pseudomonas*属菌とほぼ同様であるが、グルコースを利用しない*Alcaligenes*属菌などが分離された。白菜の場合はグラム陽性細菌ではキャベツの

場合と同様 *Micrococcus* 及び *Bacillus* 属菌が亜硝酸生成細菌として多く分離された。グラム陰性細菌においては *Enterobacteriaceae* に属する細菌や *Pseudomonas* 及び *Alcaligenes* 属菌が分離され、特に *Pseudomonas* 属菌や *Enterobacter* 属菌が多く分離された。

Table 5. Microflora of nitrite producing bacteria in cabbage and chinese cabbage.

Vegetables	Genera	Number of nitrite producing bacteria
Chinese cabbages	<i>Micrococcus</i>	45
	<i>Bacillus</i>	3
	<i>Pseudomonas</i>	38
	<i>Alcaligenes</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	10
	<i>Klebsiella</i>	2
Cabbages	<i>Micrococcus</i>	6
	<i>Bacillus</i>	10
	<i>Staphylococcus</i>	1
	<i>Pseudomonas</i>	12
	<i>Alcaligenes</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	24
	<i>Klebsiella</i>	2
	<i>Erwinia</i>	1

第3節 要 約

漬物の醗酵に影響を及ぼしていると考えられる亜硝酸及び亜硝酸生成細菌の挙動を明らかにするには亜硝酸生成細菌（硝酸還元細菌）の質的、量的な変化を調べる必要がある。そこで、亜硝酸生成細菌の選択的計数法の確立を目的に漬物原料野菜を対象とし検討を加えた結果、SAN寒天重層法を確立することができた。SAN寒天重層法は生菌数を測定し終わった培地にSAN寒天を重層し、NEDA溶液の注加による反応後、赤変コロニーを計数することによって亜硝酸生成細菌数を簡便に測定することを可能にしたものであり、亜硝酸生成細菌数を測定するには有効な手段と考えられる。さらに本方法はレプリカ法を使用することによって亜硝酸生成細菌の分離が出来るので、その点においても有用なものと思われる。

第 3 章

醗酵漬物中の各乳酸菌群の選択計数

醗酵漬物の各醗酵段階における微生物叢については先述したように醗酵開始時にはグラム陰性細菌が優勢菌群であるが、醗酵の経過に従い、球状乳酸菌の *Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* 属菌、つぎに桿状乳酸菌の *Lactobacillus* 属菌が優勢菌群となることが知られている⁵¹⁾。そして、これらの乳酸菌群の挙動が醗酵漬物の風味や品質に大きな影響を及ぼしているものと考えられる。したがって、醗酵漬物の乳酸菌群の質的、量的な変化を調べることは亜硝酸生成菌との関係を調べていく上でも極めて重要である。乳酸菌群の消長を調べる際は、一般的には代表的な菌株を培地から釣菌し、それをそれぞれ同定することによっているため、作業はかなり煩雑となることが多い。乳酸菌の分離計数に関する報告は多数^{52)~54)}あるが、その多くは乳製品を対象としたもので漬物を対象としたものは伊藤ら⁵⁵⁾によるものの他はあまりない。そこで、醗酵漬物に関連の深い乳酸菌群を数種類の培地を用いて分離計数する方法について検討を加えた。

球状乳酸菌の中でも主要な乳酸菌である *Leuconostoc* 属菌の分離計数培地に関しては α -ブロムプロピオン酸⁵²⁾、アジ化ナトリウム⁵³⁾、テトラサイクリン⁵⁴⁾な

どを添加し、分離対象外の細菌の増殖抑制を利用したものが報告されている。しかし、醗酵漬物を対象に実際に応用してみたところ、混在する他の乳酸菌の増殖がかなり認められたり、操作が煩雑なものもあり、醗酵漬物中に出現する *Leuconostoc* 属菌を分離計数することが困難であることが知られた。

そこで、著者は醗酵漬物に出現する *Leuconostoc* 属菌の多くのものがスクロースを利用し、多量のデキストランを生成することに注目し、*Leuconostoc* 属菌の分離計数を可能とする培地について検討を加えた。

Enterococcus 属菌、*Pediococcus* 属菌の分離計数は Slanetz と Bartley が考案した M-*Enterococcus* 寒天培地⁵⁶⁾が知られている。M-*Enterococcus* 寒天培地は汚水や糞便中の腸球菌用の計数培地として考案されたが⁵⁶⁾、Burkwall と Hartman はソラ豆やエンドウ豆及びハンバーガーを含む冷凍食品からの腸球菌の分離に応用し、好結果を得ている⁵⁷⁾。そこで、本培地が醗酵漬物に応用出来るかどうかについて検討を加えた。また、*Lactobacillus* 属菌に関しては LBS 寒天培地が知られており、Kempton と San Clemente は牧草飼料中の乳酸菌を LBS 培地を分離、計数に用いている⁵⁸⁾。そこで、本章においては醗酵漬物における *Lactobacillus* 属菌の分離計数に LBS 寒天培地が応用できるかについても検討を加えた。そして、それらのものを組み合わせることにより、醗酵漬物における乳酸菌群の変遷を明らかにす

る方法の開発を試みた。

第1節 方 法

1. 使用菌株

試験に使用した菌株の多くは漬物原料野菜及び醗酵漬物より当研究室において分離同定した保存菌株であるが、乳酸菌に対する分離計数の効果を調べる際には8株の参考株 (*Leuc. mesenteroides* ATCC 9135ならびに *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* IFO 012060、*Enterococcus faecalis* ATCC 10100、*Enterococcus faecium* ATCC 14436、*Ped. acidilactici* IFO 3888、*Ped. pentosaceus* IFO 3892、*Lact. plantarum* ATCC 8014、*Lact. brevis* ATCC 3345)を使用した。供試菌株の前培養は培地として次のもの(トリプチケースペプトン(Difco)5g、酵母エキス(大五栄養化学)2.5g、グルコース1g、蒸留水1l)を用い、25~30℃で1~2日間培養した。

2. 培養温度特性

乳酸菌の培養温度特性を調べる際は、培地として前培養に用いたものを使用し、一夜培養菌を培地10mlに対し、0.1ml接種し、温度帯を10~50℃の間に12段階とって調整した温度勾配培養装置を用いて、L字型培養

管で振とうしながら5時間培養した。そして、増殖の程度は培養後、分光光度計（島津、UV160A）にて660nmでの濁度をそれぞれ測定することによって得た。なお、比較の際は、最適増殖温度における濁度を1.0とした場合の各培養温度における濁度との比で表した。

3. 分離計数培地

*Leuconostoc*属菌の分離計数の試験に用いた培地組成はTable 6に示すとおりである。すなわち、デキストランの生成を促すために糖源としてスクロースを添加すると共に醗酵初期に多く出現するグラム陰性細菌の増殖を抑制する目的で2-フェニルエチルアルコールを0.25%添加したものを調製し、本培地をフェニルエチルアルコールスクロース培地（以下PES培地とする）と名付けた。培養は表面塗抹法により20℃で5日間まで行ない、コロニー形成の有無を調べた。なお、嫌気培養を行なう場合は同培地を用い、ガスパック法により行なった。

*Enterococcus*及び*Pediococcus*属菌の分離計数は前述したように腸球菌の計数培地として開発されたM-Enterococcus Agar培地(BBL)を用い、37℃で4日間培養することによって行なった。なお、培地組成はTable 7に示した。

*Lactobacillus*属菌の分離計数はLBS培地を用いて行なったが、そのままでは*Pediococcus*属菌の増殖が

見られ、分別が困難であったため、本培地の組成の一部を改変した変法LBS培地（Table 8で示すM4培地、以後M・LBS培地とする）を用い、30℃で3日間培養することによって行なった。なお、培地組成はTable 8に示した。

Table 6 Selective medium for enumerating leuconostocs
from fermented pickles

PES Medium (Phenylethyl alcohol - sucrose agar medium)	
Trypticase peptone(BBL)	5.0g
Yeast extract	0.5g
Sucrose	20.0g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g
KH ₂ PO ₄	1.0g
Agar	15.0g
2-Phenylethylalcohol	2.5g
dis. Water	1000ml

Table 7 Selective medium for enumerating enterococci and pediococci from fermented pickles

M-Enterococcus agar Medium	
Trypticase peptone	15.0g
Yeast extract	5.0g
Glucose	2.0g
Phytone peotone	5.0g
KH_2PO_4	4.0g
NaN_3	0.4g
Agar	10.0g
2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride	0.1g
dis. Water	1000ml

Table 8 Selective medium for enumerating lactobacilli from fermented pickles

M-LBS agar Medium	
Trypticase peptone	10.0g
Yeast extract	5.0g
KH_2PO_4	6.0g
Ammonium citrate	2.0g
Glucose	20.0g
Polysorbate 80	0.4g
Sodium acetate hydrate	35.0g
Acetic acid	2.5ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.575g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.12g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.034g
Agar	15.0g
dis. Water	1000ml

醗酵漬物の微生物叢を調べる際は漬液を検液とし、乳酸菌に関しては上記培地を使用した。グラム陽性細菌は0.25%フェニルエチルアルコール加標準寒天培地(栄研化学)で30℃、48時間、グラム陰性細菌はCVT寒天培地(日水製薬)で30℃、48時間、大腸菌群はデソキシコレート培地(栄研化学)で35℃、24時間、真菌は0.01%クロラムフェニコール加ポテトデキストロース培地(栄研化学)で25℃、5日間培養し、計数した。

4. 分離計数培地から分離した菌株の同定

醗酵漬物を対象にPES、M-Enterococcus及びM-LBS培地の三種類の分離計数培地を使用し、それぞれの培地に生育のみられたコロニーを無作為に約50株ずつ釣菌し、細胞形態、芽胞の有無、運動性、好氣的生育性、嫌氣的生育性、カタラーゼ、オキシダーゼ、OF試験、グルコースからのガス生成、スクロース培地におけるデキストランの生成、60℃30分加熱後の生育、pH9.6での生育、各炭水化物からの酸生成などの諸性状をもとにBergey's Manual^{48, 49)}及びGibbsら⁵⁰⁾の成書を参考にした上で属レベルでの同定を行なった。

5. 醗酵漬物試料

新たに考案した三種類の選択計数培地を用いて乳酸菌群の量的変化を調べる方法が実際の醗酵漬物に応用した場合に有効かどうかを検討する目的から、以下の方法で醗酵漬物を調製し、乳酸菌群の測定試験に供した。すなわち、原料として約15kgのキャベツを用い、水道水で良く洗浄した後、野菜スライサーで細刻したもの約5kgに食塩濃度がキャベツ重量の3%となるように食塩を添加し、5、15、30℃で醗酵を行なわせた。そして、醗酵中における乳酸菌群の経時的変化を調べた。

第2節 結果及び考察

1. 各乳酸菌の培養温度特性

醗酵漬物は開始時には主に原料野菜に由来するグラム陰性細菌の増殖が見られるが、醗酵の進行につれ早期に乳酸菌が混在する状態になるのが一般的である。そこで、醗酵漬物に出現することの多い乳酸菌を対象に、培養温度特性を調べたものが Fig. 4 である。*Leuc. mesenteroides* は 10 ~ 25℃ のやや低温な状態でも他の乳酸菌と比較して生育は良好で、増殖最適温度は 30℃ 付近であった。これに対し、それ以外の乳酸菌では桿状乳酸菌の *Lact. plantarum* 及び *Lact. brevis* は低温下でやや生育が弱く、球状乳酸菌の *Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium* 及び *Ped. pentosaceus*、*Ped. acidilactici* はかなり弱かった。そして、それらのいずれもが最適温度は 35 ~ 40℃ と高かった。したがって、以上の結果から増殖の差を考慮し、培養温度を *Leuconostoc* 属菌は 20℃、*Lactobacillus* 属菌は 30℃、*Enterococcus*、*Pediococcus* 属菌は 37℃ にすることとした。

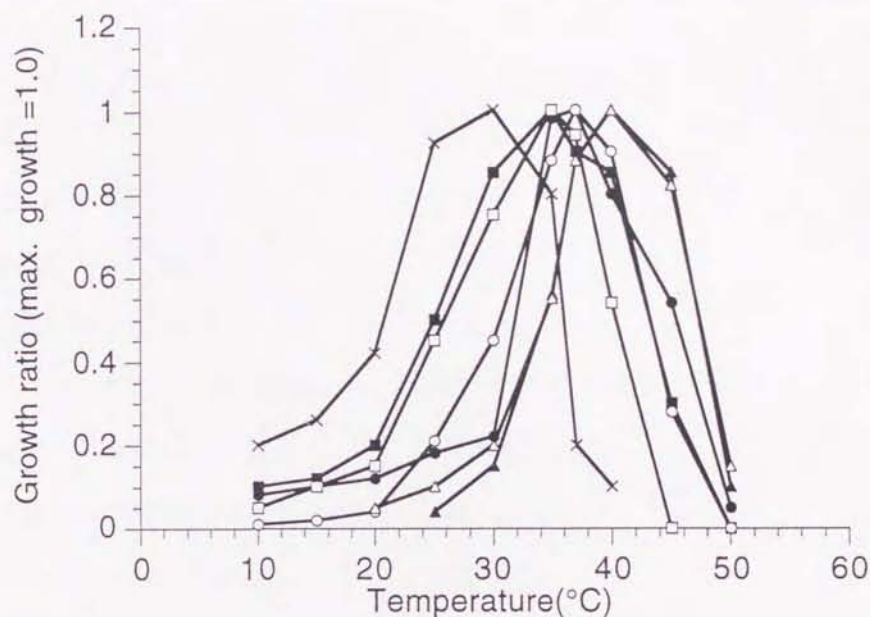


Fig. 4 Effect of temperature on the growth of lactic acid bacteria

- × : *Leuconostoc mesenteroides* IFO 12060
- : *Enterococcus faecium* ATCC 14436
- ▲ : *Pediococcus acidilactici* IFO 3888
- : *Lactobacillus brevis* ATCC 3345
- : *Enterococcus faecalis* ATCC 10100
- △ : *Pediococcus pentosaceus* IFO 3892
- : *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

2. 各種細菌のPES培地における増殖

漬物に比較的関連の深い20種の細菌を対象とし、それぞれの培養菌液を適度に希釈したものをPES培地に表面塗抹し、20℃で5日間嫌気培養を行ない、その間における増殖の様子を調べた結果がTable 9である。

Table 9 Selective growth of *Leuconostoc* sp. on PES agar medium in an anaerobic jar

Bacteria		Day				
		1	2	3	4	5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	L-11	*	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	ML-8	*	*	*	*	*
<i>Enterococcus faecium</i>	ML-12	-	*	*	*	*
<i>Streptococcus lactis</i>	ML-20	-	*	*	*	*
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ML-4	-	*	*	*	*
<i>Pediococcus acidilactici</i>	ML-5	-	-	-	*	*
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	ML-16	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	ML-18	-	-	*	*	*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	L-4	-	*	*	*	*
<i>Lactobacillus brevis</i>	L-13	-	-	*	*	*
<i>Propionibacterium</i> sp.	M-11	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	B-7	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	M-3	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	E-1	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	E-6	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E-8	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P-24	-	-	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp.	M-19	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp.	F-4	-	-	-	-	-
<i>Erwinia carotovora</i>	E-7	-	-	-	-	-
+ : growth		* : pinpoint colonies		- : no growth		

グラム陰性細菌のいずれもが増殖を抑制され、*Leuc. mesenteroides*以外の乳酸菌は生育するものの、いずれもピンポイントコロニーにとどまっていた。一方、*Leuc. mesenteroides*は2日以降、肉眼的に計数が可能な大きさとなり、特徴ある半透明でムコイド状のコロニーを形成した。なお、グラム陽性菌では*Bacillus subtilis*が好気培養において、やや不透明なムコイド状のコロニーを形成した。そこで、*Leuc. mesenteroides*が通性嫌気性菌であることを考慮し、PES培地を嫌気培養することによって*Bacillus*の生育を防止することが可能であった。したがって、*Bacillus*の汚染が予想される試料においては、PES培地に試料検液を表面塗抹後、嫌気培養することが必要と思われる。

3. 各種乳酸菌のPES培地における増殖

つぎに、漬物に関連の深い7種の乳酸菌の標準菌株及び当研究室保存株を対象とし、それぞれの培養菌液をPES培地及び標準寒天培地に表面塗抹し、20℃で4日間培養した。そして、経時的にPES培地のコロニー数を計数し、標準寒天培地におけるコロニー数と比較したものがTable 10である。*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Ped. pentosaceus*、*Lact. plantarum*、*Lact. brevis*はピンポイントコロニーにとどまり、*Ped. acidilactici*は生育が見られなかった

が、*Leuc. mesenteroides*はいずれの菌株も3日目以降は計数可能な状態に増殖し、生菌数も標準寒天培地の場合とあまり変わりがなかった。なお、実際に醗酵漬物より*Leuconostoc*属菌を分離培養した一例をFig. 5に示した。

Table 10 Viable cell counts of lactic acid bacteria on PES and standard method agar medium

Bacteria		PES ($\times 10^8$)			SMA ($\times 10^8$)
		2	3	4 days	
<i>Leuc. mesenteroides</i>	ATCC 9135	2.8	2.8	2.8	2.6
<i>Leuc. mesenteroides</i>	IFO 12060	1.2	1.2	1.2	1.3
<i>Leuc. mesenteroides</i>	L-11	*	2.4	2.4	2.6
<i>Ent. faecalis</i>	ATCC 10100	*	*	*	1.6
<i>Ent. faecium</i>	ATCC 14436	*	*	*	1.8
<i>Ped. acidilactici</i>	IFO 3888	-	-	-	2.1
<i>Ped. pentosaceus</i>	IFO 3892	*	*	*	5.4
<i>Lact. plantarum</i>	ATCC 8014	-	*	*	5.1
<i>Lact. brevis</i>	ATCC 3345	-	*	*	3.0

*: pinpoint colonies, -: no growth

SMA: standard method agar medium



Fig. 5 *Leuconostocs* on the PES agar medium

4. 各種乳酸菌の M・Enterococcus 培地における増殖

M・Enterococcus 培地は汚水や糞便中の計数培地として開発されたものであるが、本培地が *Enterococcus* 属菌及び *Pediococcus* 属菌の選択計数培地として応用可能かどうかについて検討を加えた。Table 11 は各乳酸

菌の培養菌液のM-Enterococcus培地でのコロニー数を計数し、標準寒天培地におけるコロニー数と比較したものである。*Leuc.mesenteroides*、*Lact.plantarum*、*Lact.brevis*はいずれも増殖が抑制されたが、*Enterococcus*属菌はトリフェニルテトラゾリウムクロライドの還元による赤色コロニーを形成し、*Pediococcus*属菌は白色のコロニーを形成した。計数の結果、菌数も標準寒天培地の場合とあまり変わりがなく、M-Enterococcus培地は*Enterococcus*及び*Pediococcus*属菌の選択計数に応用可能と考えられた。なお、実際分離計数の例として、Fig.6に*Enterococcus*属菌、Fig.7に*Pediococcus*属菌の、また、それらが混合したものから分離計数をおこなっている例をFig.8に示した。



Fig. 6 Enterococci on M-Enterococcus agar medium



Fig. 7 *Pediococci* on M-*Enterococcus* agar medium



Fig. 8 *Enterococci* and *pediococci* on M-*Enterococcus* agar medium

Table 11 Viable cell counts of lactic acid bacteria
on M-Enterococcus and standard method agar

Bacteria		M-Enterococcus agar($\times 10^8$)			SMA($\times 10^8$)
		2	3	4days	
<i>Ent. faecalis</i>	ATCC 10100	4.2r	4.2r	4.2r	4.3
<i>Ent. faecalis</i>	ML-8	1.5r	1.5r	1.5r	1.5
<i>Ent. faecium</i>	ATCC 14436	7.6r	8.0r	8.0r	8.0
<i>Ent. faecium</i>	ML-12	3.4r	3.4r	3.4r	3.6
<i>Ped. pentosaceus</i>	IFO 3892	1.0w	1.1w	1.1w	1.2
<i>Ped. pentosaceus</i>	ML-4	1.2w	1.3w	1.3w	1.2
<i>Ped. acidilactici</i>	ML-5	*	1.0w	1.1w	1.2
<i>Leuc. mesenteroides</i>	ATCC 9135	-	-	-	2.5
<i>Lact. plantarum</i>	ATCC 8014	-	-	-	1.1
<i>Lact. brevis</i>	ATCC 3345	-	-	-	3.8

*: pinpoint colonies, -: no growth, r: red colony, w: white colony
SMA: standard method agar

5. LBS培地の改変及び各種乳酸菌のM・LBS培地における増殖

LBS培地は乳製品、牧草飼料⁵⁸⁾および糞便中^{59, 60)}の乳酸菌の選択培地として利用された例はあるが、漬物を対象にしたものについてはほとんど見当たらないのでLBS培地を用い、培養温度30℃で4日間培養し、L

actobacillus 属菌に対する選択性について調べ、Table 12の結果を得た。市販のLBS培地をそのまま使用すると*Pediococcus*属菌の増殖が認められ、*Lactobacillus*属菌との判別が困難であったので本培地の改変を試み、酢酸及び酢酸ナトリウムの添加量を変えてみたところ、培地1000mlに対し酢酸を2.5ml、酢酸ナトリウムを35gとすることによって*Pediococcus*属菌の増殖をピンポイントコロニー以下にとどめることができた。しかし、酢酸を3.7ml、酢酸ナトリウムを40gとした場合は*Lactobacillus*属菌もピンポイントコロニーとなった。なお、各乳酸菌の培養菌液を改変培地(M-LBS培地)及び標準寒天培地に表面塗抹し、30℃で4日間培養し、その間におけるコロニー数の変化を調べたところ、*Enterococcus*及び*Leuconostoc*属菌は増殖が抑制され、4日後においてもコロニーの形成は見られず、また、*Pediococcus*属菌は3日後以降コロニーの形成が見られたが、ピンポイントコロニーにとどまった。一方、*Lactobacillus*属菌は3日目からコロニーを形成し、4日目には標準寒天培地における菌数とほぼ同様の菌数となったことから、*Lactobacillus*属菌の選択計数にはM-LBS培地が有効と考えられた。なお、実際にM-LBS培地を使用して、*Lactobacillus*属菌の分離選択を行なった例をFig.9に示した。

Table 12 Effects of acetic acid and Na- acetate in LBS agar medium on the number of lactic acid bacteria incubated at 30°C for 3 days

		CFU($\times 10^8$)					
		LBS					
Strains		M1	M2	M3	M4	M5	SMA
<i>Lact. plantarum</i>	ATCC 8014	4.1	4.2	4.1	4.2	*	4.3
<i>Lact. plantarum</i>	IFO 3074	1.3	1.2	1.4	1.4	*	1.4
<i>Lact. plantarum</i>	L-4	1.7	1.5	1.5	1.6	*	1.5
<i>Lact. brevis</i>	ATCC 3345	1.3	1.3	1.3	1.4	*	1.3
<i>Lact. brevis</i>	L-3	3.2	3.2	3.3	3.1	*	3.3
<i>Leuc. mesenteroides</i>	ATCC 9135	-	-	-	-	-	3.4
<i>Ent. faecalis</i>	ATCC10100	-	-	-	-	-	4.1
<i>Ent. faecium</i>	ATCC14436	-	-	-	-	-	2.8
<i>Ped. acidilactici</i>	IFO 3888	1.2	1.3	*	*	*	1.3
<i>Ped. pentosaceus</i>	IFO 3892	3.7	4.1	*	*	*	4.0

* : pinpoint colonies, SMA : standard method agar

The following amount of chemicals has been supplemented into 1000ml LBS agar medium

Medium	Acetic acid(ml)	Na-acetate(g)
M1	0	25
M2	1.32	25
M3	1.90	30
M4	2.50	35
M5	3.70	40

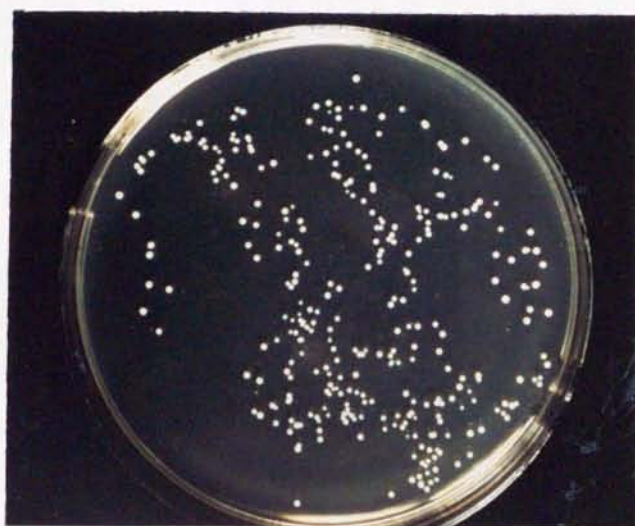


Fig. 9 Lactobacilli on the M-LBS agar medium

6. 醗酵漬物への各分離計数培地の応用

醗酵漬物を対象にPES、M・Enterococcus及びM・LBS培地を用いて選択分離を行ない、PES培地では嫌気培養を行なった後、ムコイド状のコロニーを釣菌し、好気培養したM・Enterococcus培地からはピンポイントコロニーを除いた赤色及び白色コロニー、M・LBS培地からはピンポイントコロニーを除いた他のコロニーから無作為に釣菌した約150株の菌株の同定を行なった。その結果はTable 13に示すようにPES培地から分離した

細菌の全てが *Leuconostoc* 属菌で、M-Enterococcus 培地より分離したものでは *Enterococcus* 及び *Pediococcus* 属菌に計数されるもののなかに一部混在が見られた。また、M-LBS 培地より分離したものではほとんどが *Lactobacillus* 属菌で、一部 *Pediococcus* 属菌の混在がみられたものの概ね良好な結果であった。

Table 13 Isolated bacteria from PES, M-Enterococcus
and M-LBS medium

Media	Isolated bacteria				
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Others
PES	48	0	0	0	0
M-Enterococcus					
Red colony	0	26	3	0	1
white colony	0	0	28	0	0
M-LBS	0	0	2	43	0

7. 醗酵漬物における各乳酸菌群の計数

3種類の選択計数培地を使用した各乳酸菌群の選択計数が実際の醗酵漬物に対して応用可能かどうかをみる目的から、キャベツを原料野菜に30℃で醗酵を行ない、経過にともなう各乳酸菌群の生菌数変化について調べた結果をFig. 10に示した。その際、同時にグラム陽性細菌数、グラム陰性細菌数、酵母数についても調べ、比較検討した。30℃で醗酵させた場合はグラム陰性細菌は1日後に $10^6/\text{ml}$ に達した後、pHの低下にともない減少し、4日目には死滅した。*Leuconostoc*属菌は開始時には $10^2/\text{ml}$ であったが、醗酵の進行にしたがって急速に増加し、3日目には $10^8/\text{ml}$ に達した。

*Enterococcus*属菌は2日目に、*Pediococcus*属菌は4日目に $10^6/\text{ml}$ のピークに達した。しかし、引き続き*Lactobacillus*属菌の増殖によって、漬液のpHが3.8以下になる頃から、球状乳酸菌は減少し始め、*Enterococcus*属菌は6日目、*Leuconostoc*属菌及び*Pediococcus*属菌は8日目には死滅し、代わって酵母が増殖した。

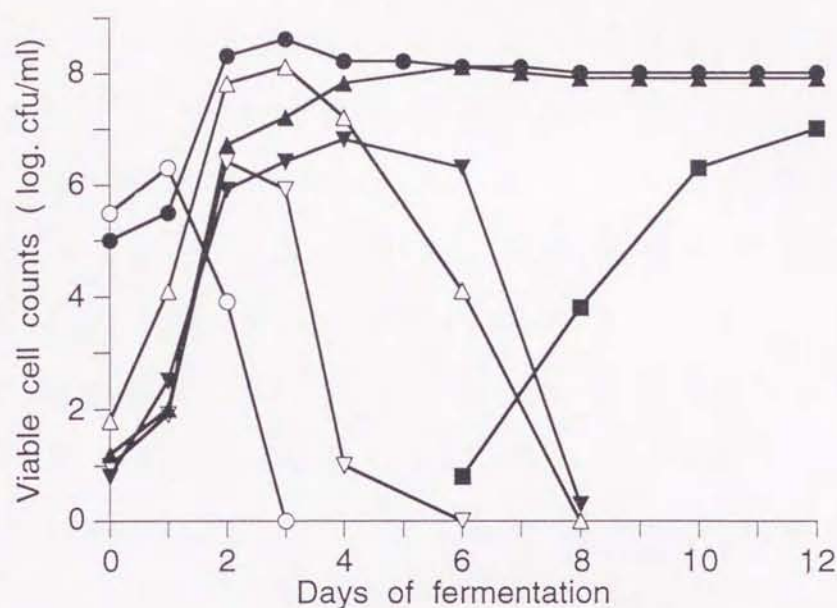


Fig. 10 Changes in microflora during the fermentation of cabbage at 30°C

- : Gram positives ○ : Gram negatives
 △ : *Leuconostoc* ▽ : *Enterococcus*
 ▼ : *Pediococcus* ▲ : *Lactobacillus*
 ■ : Yeasts

以上の結果から、実際の醗酵漬物においても3種類の選択計数培地を使用することによって、各乳酸菌群の生菌数を容易に計数することが可能であり、これまでに得られた漬物における微生物叢変化の傾向と同様の結果を得ることができた。したがって、醗酵漬物における微生物叢と漬物の品質との関係を調べる上で有効な手段と考えられた。

第3節 要 約

醃酵漬物中の各乳酸菌群を容易に選択計数するための培地としてPES培地を考案すると共にM-Enterococcus及びM-LBS培地を使用した場合の選択計数効果について醃酵漬物に関連の深い細菌を対象に検討を加えた。その結果、*Leuconostoc*属菌の選択計数は*Leuconostoc*属菌が有するデキストラン生成能と共存するグラム陰性細菌の増殖抑止を考慮し、スクロースとフェニルエチルアルコールを添加したPES培地（フェニルエチルアルコールスクロース培地）を用い、*Leuconostoc*属菌が増殖しやすく、かつ他の菌が増殖しにくい温度として20℃で、3～4日間嫌気培養することで選択計数を可能とした。このように漬物から*Leuconostoc*属菌を選択計数することを可能にしたものは本培地が初めてであり、漬物における微生物叢の解析には非常に有効なものと考えられる。

*Enterococcus*及び*Pediococcus*属菌の選択計数はM-Enterococcus培地を用いることにより、目的外の細菌の増殖は顕著に抑制を受けると共に、*Enterococcus*属菌はトリフェニルテトラゾリウムクロライドの還元による赤色コロニーの形成、*Pediococcus*属菌は白色コロニーを形成すること、また、増殖温度帯が37℃であることを利用し、上記培地を用いて37℃、4日間好気培養することにより、それぞれの乳酸菌を選択計数する

ことを可能とした。

*Lactobacillus*属菌の選択計数は市販されている選択計数培地であるLBS培地をそのまま利用すると*Pediococcus*属菌の生育がみられたので、*Pediococcus*属菌の増殖を抑制する目的からLBS培地に酢酸及び酢酸ナトリウムを添加したM・LBS培地（改変LBS培地）を新たに考案した。また、*Lactobacillus*属菌の増殖温度特性から30℃、4日間好気培養することにより醗酵漬物から*Lactobacillus*属菌を選択計数することを可能とした。

以上の結果にもとづき3種類の選択計数培地を用いることによって、醗酵漬物に出現する各乳酸菌群の選択計数が可能となったので、実際にキャベツの醗酵漬物において検討を加えたところ、有用な結果を得ることができた。したがって、醗酵漬物の乳酸菌群の挙動を解析する場合は、PES、M・Enterococcus、M・LBS培地を組み合わせた方法を利用することが有効な手段と考えられる。