

第4章

正常な醗酵漬物における微生物及び化学的变化

醗酵漬物における亜硝酸の蓄積による異常醗酵を論ずる前に、正常に醗酵した場合の各製造段階における微生物及び化学的变化を調べておく必要がある。そこで、本章においては小カブを原料野菜とし、各製造段階における微生物、特に乳酸菌と亜硝酸生成細菌の挙動について検討を加え、あわせて、醗酵漬物の風味成分として重要な有機酸の変化について検討を加えることとした。

第1節 方法

1. 醗酵漬物の調製

約10kgの小カブに対し、食塩を最終濃度3.0%になるように添加し、小カブ全重量の半量である約5kgの差水を加え、一晚荒漬した後、水洗し、再び食塩が3.0%になるように添加した。つぎに小カブと同重量の重石をおいた後、28~30℃で醗酵を行なった。

2. 有機酸の定量

醗酵漬物の酸度は0.02N水酸化ナトリウム溶液を用い

て測定し、乳酸として算出した。また、醗酵中における有機酸の定量は山下らの方法⁶¹⁾に準拠し、有機酸類をブチルエステル化し、ガスクロマトグラフにより分析した。ガスクロマトグラフは島津GC4-B、検出器はFIDを用いて行なった。分析条件は2m×3mmガラスカラム、5%Reoplex 400 on Chromosorb W AW、60~80Mesh、Detector と Injection温度は235℃、カラム温度は50℃、6分保持後、210℃まで6℃/minで昇温させて分析した。キャリアーガスは窒素で流量は60ml/minで行った。

3. 生菌数の測定

一般細菌数の測定は、醗酵漬物を細刻した後、無菌的に約10g採取し、ダイリ्यूター（スパイラルシステムインスツルメンツ、グラビメトリックダイリ्यूターGD-150）で100gになるよう滅菌生理的食塩水を添加し、ストマッカー（ゲンゼ産業）を用いて均一化した。つぎに、常法どおり10倍段階希釈を行なった後、標準寒天培地（栄研化学）を用いた混釈法にて30℃、3日間培養後、計数した。乳酸菌数はTable 14で示したGYP白亜寒天培地を調製し、混釈法にて30℃、3日間培養後、周辺にクリアゾーンを有するコロニーを計数することにより行なった。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て28℃、3日間培養後、赤変コロニーを計数することにより行なった。また、酵母は

PDA寒天培地（栄研化学）に0.01%になるようクロラムフェニコールを添加した選択培地を使用し、28℃、5日間培養することにより行なった。

Table 14 GYP medium

| | |
|---|--------|
| Glucose | 10g |
| Yeast extract | 10g |
| Peptone | 5g |
| Meat extract | 2g |
| CH ₃ COONa · 3H ₂ O | 2g |
| Salt solution *1 | 5ml |
| Tween 80 solution *2 | 10ml |
| CaCO ₃ | 5g |
| agar | 12g |
| dis. water | 1000ml |

*1: MgSO₄ · 7H₂O 40mg, MnSO₄ · 4H₂O 2mg
FeSO₄ · 7H₂O 2mg, NaCl 2mg /ml

*2: 50mg/ml

4. 細菌の分離及び同定

細菌の分離は各計数培地より、釣菌した後、主に普通寒天培地を用いて純粋培養を行なった。特に、乳酸菌の分離に関しては、3章で述べた方法、すなわち、PES、M-Enterococcus、M-LBS培地を用いる方法にて分離を行なった。また、亜硝酸生成細菌の分離は主に原料野菜や醗酵開始時の小カブを対象に第2章で記述した方法、すなわち、SAN寒天重層法とレプリカ法を利用した方法で行なった。以上の方法により、分離された菌株は純粋

培養後、コロニーの形態、グラム染色性、顕微鏡観察（形態、運動性、芽胞の有無）から、約280株に整理し、その後、OFテスト、カタラーゼ、オキシダーゼテストを実施し、さらに大まかな群に分けた後、それらの代表的な菌株について既報⁴⁸⁻⁵⁰⁾に準じて同定を行なった。

5. 分離菌株の耐塩性

供試菌株はあらかじめ基礎培地（トリプチケースペプトン（BBL）0.5%、酵母エキス（Difco）0.25%、グルコース0.1%、pH6.0）を用いて、30℃、2日間前培養した。耐塩性を見る際は食塩濃度がそれぞれ0、2、4、6、8%になるように基礎培地に添加し、中試験管にそれぞれ10mlずつ分注し、滅菌した。つぎに、前培養によって得た菌液を均一になるよう良く振とうした後、上記各培地に無菌的にそれぞれ0.1mlずつ接種し、30℃、48時間培養した。培養後、分光光度計で660 nmにおける濁度を測定し、対照における濁度と食塩含有培養液における濁度との比から耐塩性を表現した。

6. 分離菌株のpH耐性

耐塩性を検討する際に用いた培地と同様の培地にて、供試菌株を30℃、2日間前培養した後、その菌液をpH

をそれぞれ4.2、4.4、4.6、5.0、5.5に調整した培養液（10 ml）に無菌的に0.03 mlずつ接種し、30℃で7日間培養し、増殖の有無をしらべた。

第2節 結果及び考察

1. 醗酵中における各微生物群の消長

小カブの28℃での醗酵中における各微生物群及びpHの変化をFig. 11に示した。醗酵開始時、下漬け段階ですでに $2.4 \times 10^5 / \text{ml}$ 存在していた球状乳酸菌は開始後急激に増殖し、1日後には $3.8 \times 10^7 / \text{ml}$ に達し、それにとまなう乳酸の生成によりpHは低下し始め、原料野菜に多く付着していたグラム陰性細菌は減少した。2日目からは桿状乳酸菌が増殖し始め、3日目には $10^8 / \text{ml}$ を超える菌量に達し、pHはさらに低下し、6日目に至り、pHは3.25にまで低下した。この結果、低pHに弱い球状乳酸菌は減少し、グラム陰性細菌は4日目には死滅した。一方、酵母は醗酵開始時において $7.8 \times 10^2 / \text{ml}$ であったが、pHが低下し始めた2日目以降から急激に増殖し、6日目には $10^8 / \text{ml}$ に達した。

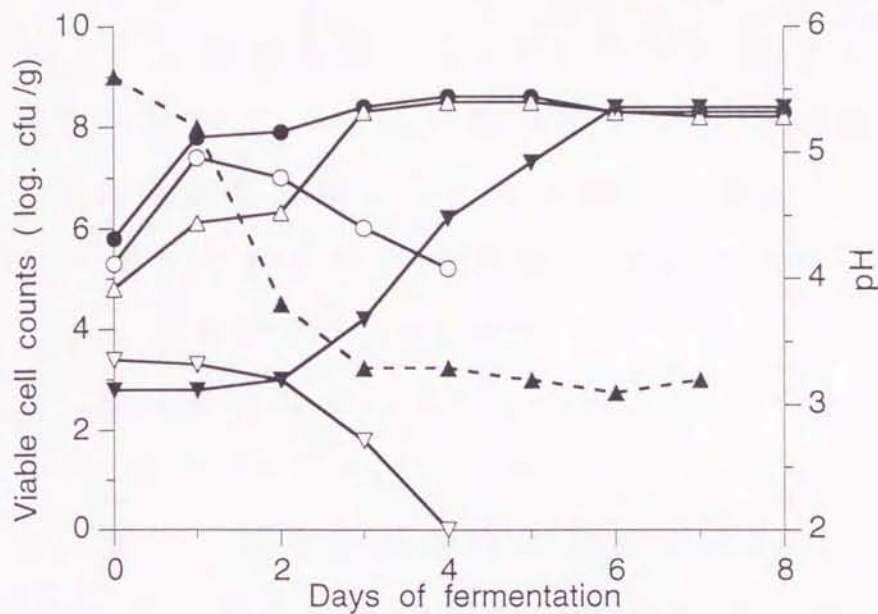


Fig. 11 Changes of viable cell counts and pH during fermentation of turnips at 28°C

- : Total bacteria ○ : Lactic acid bacteria(sphere)
 ▽ : Gram negative bacteria △ : Lactic acid bacteria(rod)
 ▼ : 酵母 ▲ : pH

2. 醃酵漬物における微生物叢変化

醃酵の経過にしたがって漬液より分離した細菌の同定を試みたところ、醃酵初期（0～2日目）に分離された微生物の多くは球状乳酸菌で、その他に *Micrococcus*、*Pseudomonas*、*Enterobacteriaceae* に属する細菌、少数菌としてコリネ型細菌、*Erwinia* 属菌が分離された。

醗酵中期（3～5日目）になると球状乳酸菌は減少し、桿状乳酸菌が優勢となり、少数の酵母が分離され始め、以後増加した。醗酵後期（6～8日目）に達すると微生物叢は比較的安定し、桿状乳酸菌以外の細菌はほとんど死滅し、桿状乳酸菌と酵母からなる単純な構成となった。つぎに、分離された代表的な菌株について形状、グラム染色性、生化学性状について調べ、さらに詳しく同定したところ、球状乳酸菌としては *Leuc. mesenteroides*、*Enterococcus faecalis*、*Ped. pentosaceus* と同定された。また、桿状乳酸菌のほとんどは *Lact. plantarum* であった。それら乳酸菌の性状については Table 15 に示した。乳酸菌以外の細菌について同定したところその代表的な菌株の多くは *Micrococcus varians*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas* sp.、コリネ型細菌で、*Enterobacteriaceae* に属する細菌としては *Erwinia* sp.、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae* などであった。なお、それらの菌株の性状については、Table 16 に示した。また、分離された亜硝酸生成細菌のうち代表的なものを Table 17 に示した。

Table 15 Characteristics of isolated lactic acid bacteria

| | L1 | L2 | L3 | L4 |
|-------------------------------|------|-----|-----|-----|
| Gram | + | + | + | + |
| Cell | S | S | S | R |
| Motility | - | - | - | - |
| Catalase | - | - | - | - |
| Oxidase | - | - | - | - |
| OF test | F | F | F | F |
| Growth at | | | | |
| 15°C | + | + | + | + |
| 37°C | - | + | + | + |
| 45°C | - | + | - | - |
| Survive 60°C/30min | - | + | + | + |
| Growth at pH | | | | |
| 4.4 | + | + | + | |
| 8.6 | + | + | - | |
| 9.6 | - | + | - | |
| Slime formation from sucrose | + | - | - | - |
| NH ₃ from Arginine | | + | + | + |
| Esculin hydrolysis | - | + | + | + |
| Lactic acid | D(-) | DL | DL | DL |
| Final pH | 4.3 | 3.8 | 4.0 | 3.8 |
| Acid from | | | | |
| Arabinose | + | + | + | - |
| Glucose | + | + | + | + |
| Lacose | + | + | - | - |
| Maltose | + | + | + | + |
| Mannitol | + | + | - | |
| Raffinose | + | - | - | + |
| Rhamnose | - | - | - | |
| Salicin | + | - | + | + |
| Sorbitol | - | - | + | + |
| Sucrose | + | + | + | + |
| X ylose | + | + | + | - |
| Gas from Glu | + | - | - | - |

S : Sphere R : Rod

L1 : *Leuconostoc mesenteroides*L2 : *Enterococcus faecium*L3 : *Pediococcus pentosaceus*L4 : *Lactobacillus plantarum*

Table 16 Characteristics of isolated strains from fermented turnips

| | A1 | A2 | A22 | A23 |
|-------------------------|----|----|-----|-----|
| Gram | + | - | + | - |
| Cell | S | R | R | R |
| Spore | - | - | - | - |
| Motility | - | + | - | + |
| Flagella | - | + | - | + |
| Pigment | + | - | + | - |
| Fluorescent pigment | - | + | - | - |
| Catalase | + | + | + | + |
| Oxidase | - | + | - | + |
| OF test | O | O | O | O |
| Decomposition of | | | | |
| gelatin | + | + | + | - |
| starch | - | - | - | - |
| esculin | - | - | + | + |
| arginine | - | + | - | - |
| Growth in | | | | |
| MacConkey media | | + | | + |
| SS media | | + | | - |
| KCN media | | - | | - |
| Media at 42 °C | | - | | - |
| V.P. reaction | - | - | - | - |
| Assimilation of citrate | | + | - | + |
| Indole | | - | | - |
| Nitrite from nitrate | + | + | + | + |
| Acid from Arabinose | - | + | + | + |
| Lactose | + | - | - | - |
| Maltose | + | - | + | - |
| Mannitol | + | - | + | - |
| Sallicin | + | - | + | - |
| Sorbitol | + | - | - | - |
| Sucrose | + | - | + | + |
| Xylose | - | - | + | + |

S : Sphere R : Rod

A1 : *Micrococcus varians* A2 : *Pseudomonas fluorescens*A22: Coryneform bacteria A23: *Pseudomonas* sp.

Table 17 Microbial characteristics of nitrite producing bacterial strains isolated from turnips

| | GP1 | GP3 | GP5 | C7 | C24 | E1 | E2 | E6 | E7 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|----|-----|----|----|----|----|
| Gram | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Cell | S | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Motility | - | - | | + | + | + | + | + | + |
| Catalase | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxidase | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| OF test | O | F | O | O | O | F | F | F | F |
| Spore | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Pigment | + | + | - | - | - | - | - | - | + |
| Fluorescent pigment | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| Growth at 42°C | | | | - | - | - | | | |
| V P reaction | - | - | + | - | - | + | + | - | + |
| IPA | | | | | | - | - | - | - |
| H ₂ S production | | | | | | - | - | + | - |
| Citrate | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Gelatin hydrolysis | + | + | + | + | + | + | - | - | + |
| Starch hydrolysis | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| Esculin hydrolysis | | | + | - | - | - | + | - | - |
| Lysine decarboxylase | | | | | | - | + | - | - |
| Ornithine decarboxylase | | | | | | + | + | - | - |
| Acid from Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Arabinose | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Rhamnose | | | | | | + | + | + | + |
| Xylose | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | + | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Sucrose | + | + | + | - | - | + | + | + | + |

S : Sphere R : Rod

GP1 : *Micrococcus varians*

GP3 : Coryneform bacteria

GP5 : *Bacillus* sp.C7 : *Pseudomonas* sp.C24 : *Pseudomonas* sp.E1 : *Enterobacter cloacae*E2 : *Enterobacter aerogenes*E6 : *Citrobacter freundii*E7 : *Erwinia* sp.

3. 分離菌株の耐塩性及びpH耐性

醗酵漬物の製造開始時においては食塩を散布する関係上、一時的に高濃度の食塩環境下に置かれるので、微生物はその耐塩性の差異により、淘汰されることが予想される。そこで、分離した代表的な菌株を用いてそれらの耐塩性について調べたところ、Fig. 12で示す結果を得た。すなわち、コリネ型細菌、*Pseudomonas* sp.、*Pseudomonas fluorescens*は食塩濃度が4.0%ではほとんど増殖できなくなったが、*Micrococcus varians*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*は食塩濃度が8.0%においても生育可能で食塩に対する耐性を示した。

また、耐塩性と同様に、分離菌株のpH耐性について調べたのがTable 18である。醗酵初期から中期にかけて減少死滅した細菌は始めにコリネ型細菌、*Pseudomonas*属菌、*Micrococcus*属菌で、つぎに、*Enterobacteriaceae*に属する細菌であったが、これらの順序と同様なpH耐性に関する強弱の差異が見られ、コリネ型細菌はpH5.0の培養液中で1週間以内では生育は認められず、*Pseudomonas*属菌、*Micrococcus*属菌はpH4.6では生育できたが、pH4.4では生育できなかった。しかし、*Ent. aerogenes*、*Ent. cloacae*はpH4.4でも生育可能でpH4.2以下になって生育できなくなった。したがって、正常な醗酵漬物の微生物叢変化において、*Enterobacteriaceae*に属している菌種が長く生存し得た

のはこの高い耐塩性とpH耐性に帰因するものと考えられた。

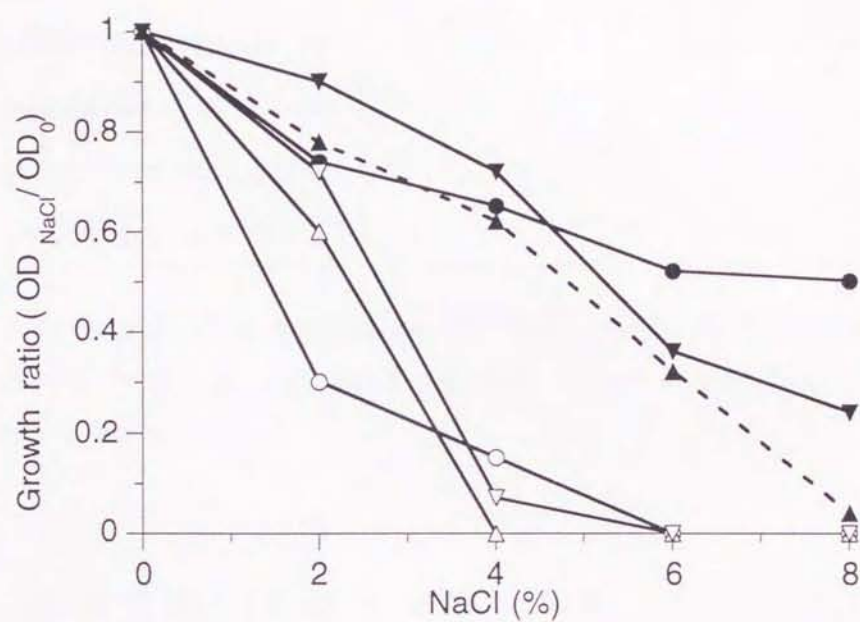


Fig. 12 Salt tolerance of bacteria isolated from turnips

Bacteria were cultivated in media containing certain amounts of NaCl at 30°C for 48 hr

- : *Micrococcus varians* GP1 ○ : *Coryneform bacteria* GP3
 △ : *Pseudomonas sp.* C7 ▽ : *Pseudomonas fluorescens* C24
 ▼ : *Enterobacter aerogenes* E2 ▲ : *Enterobacter cloacae* E1

Table 18 Effects of pH on the growth of various bacteria isolated from turnips or fermented turnips

| | pH | | | | |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 4.2 | 4.4 | 4.6 | 5.0 | 5.5 |
| <i>Corynebacterium</i> sp. GP3 | - | - | - | - | - |
| <i>Micrococcus varians</i> GP1 | - | - | + | + | + |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> C24 | - | - | + | + | + |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> E2 | - | + | + | + | + |
| <i>Enterobacter cloacae</i> E1 | - | + | + | + | + |

The cultivation was carried out in PYG media at indicated pH at 30 °C. Symbols indicate no growth within 7 day (-), growth within 7 days (+)

4. 醗酵漬物の各種有機酸の消長

漬物の醗酵中における各種有機酸の消長について調べた結果をFig. 13に示した。醗酵開始時において、乳酸、コハク酸、酢酸はそれぞれ20mg/100g、7.5mg/100g、4.0mg/100gであったが、醗酵の進行に伴って、それぞれ増加し、2日目以降からは急激に増加した。そして、6日目にはそれぞれ1120mg/100g、16.0mg/100g、38.5mg/100gに達した。これらはいずれも微生物、特に乳酸菌の増殖及び活動の結果と考えられる。一方、醗酵開始時に13.0mg/100g

存在していたリンゴ酸は3日目に痕跡程度となり、4日目以降は検出されなくなったが、これは、マロラクチック醗酵などにより微生物に利用されたものと考えられた。

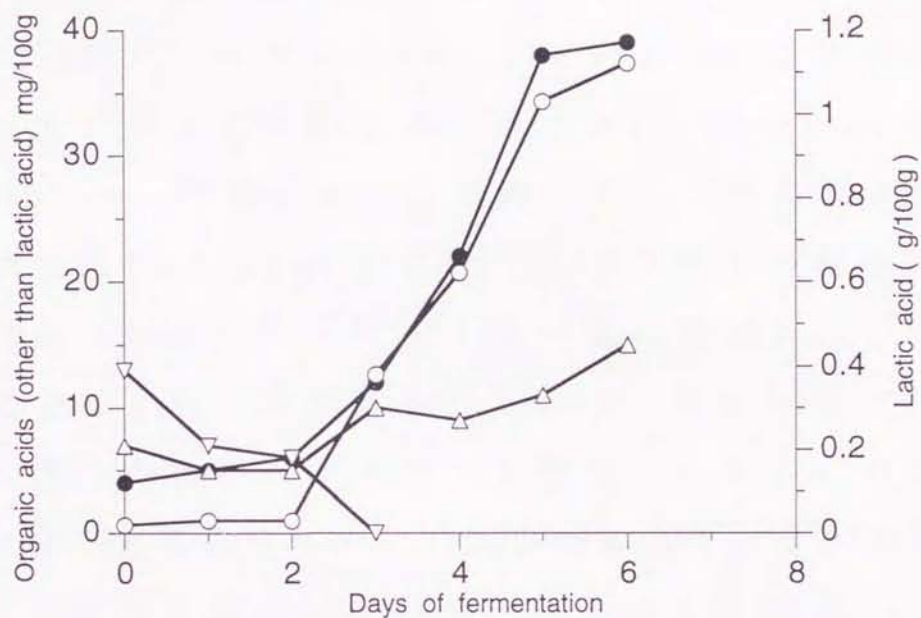


Fig. 13 Changes in the amount of organic acids during fermentation of turnips

○ : Lactic acid ● : Acetic acid
 △ : Succinic acid ▽ : Malic acid

第3節 要約

本章においてはカブを対象に、正常な醗酵が行なわれた場合の微生物叢の変化、特に、乳酸菌、亜硝酸生成

細菌について調べ、主要な分離菌株を同定した。その結果、サワークラウトなどと同様に、醗酵初期には乳酸菌では球状乳酸菌の *Leuc. mesenteroides*、*Enterococcus faecalis*、*Ped. pentosaceus* が出現し、乳酸菌以外ではコリネ型細菌、*Micrococcus*、*Pseudomonas*、*Enterobacter*、*Erwinia* 属菌が分離されており、その多くは亜硝酸生成能を有していた。そして、中期以降になると桿状乳酸菌の *Lact. plantarum* などが主要細菌となり、初期に出現の見られた *Pseudomonas*、*Enterobacter* 属菌は減少、死滅した。このような微生物叢の変化は Pederson らのサワークラウトの醗酵に關与する微生物の報告²⁶⁻²⁸⁾ とほぼ一致しており、正常な醗酵経過をたどった醗酵漬物であれば、他の醗酵漬物においても同様な傾向となることが予想される。このような微生物叢の変遷はそれぞれの細菌が有している耐塩性、pH 耐性と醗酵の経過に従って生成される乳酸量に大きく影響されることが予想されるので、野菜原料や醗酵漬物から分離した菌株を対象にそれぞれの耐塩性、pH 耐性を調べたところ、醗酵初期に減少、死滅する傾向の見られた細菌の多くは pH 耐性も低いものが多く、醗酵中期以降に優勢菌となる *Lactobacillus* 属菌などは pH 耐性も高いものが多かった。従って、正常に醗酵が進行している漬物における微生物叢の変化には乳酸の生成にともなう pH の変化が第一義的に關与しているものと考えられる。

第 5 章

醗酵漬物における亜硝酸の蓄積と異常醗酵

醗酵漬物の製造過程における微生物の挙動が醗酵漬物の品質に大きな影響を及ぼしていることに注目し、特に影響が大きいと思われる亜硝酸生成細菌と各乳酸菌群の選択計数に関しては、2、3章までにおいて検討を加え、正常醗酵における微生物の変化については4章において検討を加えた。そこで、本章においては、今までの成果をもとに、醗酵漬物における亜硝酸の蓄積と異常醗酵に関し、特に、細菌の増殖との関連について検討を加えた。

第 1 節 方 法

1. 漬物の調製

原料野菜として約10kgのカブを使用した。それらを良く洗浄した後、ホウロウ製のタンクに入れ、野菜重量に対し3%の食塩を均一に加えた。つぎに野菜重量と同重量の重石をし、さらに野菜重量の半量の食塩濃度3%の差し水をした。一晚、室温で荒漬し、軽く洗浄した後、荒漬後のカブ重量に対し同重量の3%食塩水を加え、本漬とし、20℃で醗酵を行なった。試料は良く攪拌した漬液から必要な時に採取し、測定に供した。

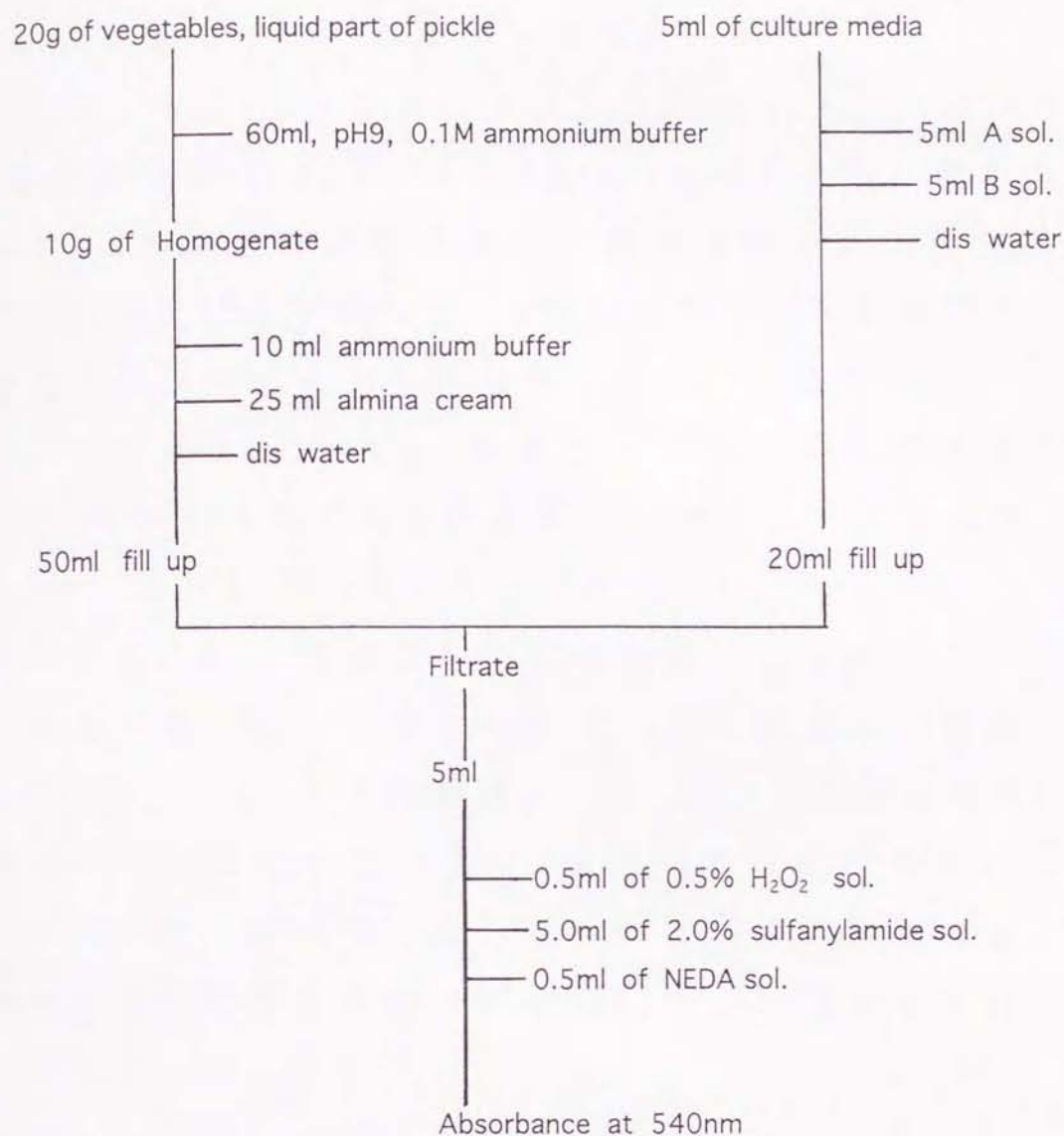
2. 細菌数の計数及び分離菌株の同定

原料野菜の細菌調査に用いた試料原液は細刻した試料をストマッカー用の袋に10g採取し、滅菌リン酸緩衝液90mlを入れた後ストマッカーを用いて均一化することによって得た。また、醗酵漬物の場合は漬液から10mlを採取し、滅菌リン酸緩衝液90mlの入った滅菌ビンに加え、良く混和することによって得た。生菌数はそれぞれの試料原液の10倍段階希釈を行なった後、標準寒天培地（栄研化学）を用い、表面塗抹法により30℃、2日間培養することによって得た。グラム陽性細菌数は選択培地として0.25%になるように2-フェニルエチルアルコールを添加した標準寒天培地を用い、30℃、4日間培養後出現したコロニー数から算出した。グラム陰性細菌数はCVT寒天培地（日水製薬）を用い、30℃、2日間培養後出現した赤変コロニー数から算出した。乳酸菌数の測定は、第3章で報告した培地を組み合わせる方法を用いて行なった。また、亜硝酸生成細菌は第2章で示したSAN寒天重層法を使用した。なお、亜硝酸生成菌が全体のうちに占める割合を見る際は、生菌数を計数した標準寒天培地平板から無作為に約200株を分離し、硝酸還元能を常法によって調べると共に、Bergey's Manual^{48, 49)}及びCowanの成書⁶²⁾を参考に同定を行ない、原料野菜のカブに付着している細菌及び亜硝酸生成細菌の分布状況を調べた。

3. 亜硝酸の定量及びpHの測定

漬液に生成する亜硝酸の定量方法の概略はFig. 14に示す通りであるが、検液に至るまでの前処理において、漬物を出発材料とする場合には葉緑素の影響を避けるために調製したアルミナクリームで処理を行ない、培養液を出発材料とする場合はNormanらの方法⁶³⁾を改良した祐川ら⁶⁴⁾の除蛋白剤（A: 90 g チオシアン酸アンモニウム、80 g 塩化第2水銀 / 1 l 蒸留水、B: 250 g 酢酸亜鉛 / 1 l 蒸留水）を用いて蛋白質を除去し、検液を調製した。つぎに検液に対しスルファニルアミド溶液（20 g スルファニルアミド、50 ml リン酸（80%） / 1 l 蒸留水）を作用させてジアゾ化を起こさせ、引き続きN-（1-ナフチル）エチレンジアミン・ジヒドロクロライドをカップリングさせることによって生じるアゾ色素を540 nmで比色定量することによって行なった⁶⁴⁾。

また、pHの測定は電極法により行なった。



A sol.: 90 g of Ammonium thiocyanate, 80g of Mercury bichloride / 1 l water

B sol.: 250g of Zinc acetate / 1l water

NEDA: 0.5g N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride / 100ml water

Ammonium buffer: 50g of ammonium chloride and ammonium water / 1 l water, pH 9.6

Fig. 14 Analytical method of NO_2^-

4. 亜硝酸存在下での細菌の増殖度の測定

供試菌株はTable 19に示した15株である。それらのうち13株は漬物原料野菜及び醗酵漬物より当研究室で分離同定した保存菌株で、2株は譲与された菌株である。培養にはトリプチケースペプトン5g、酵母エキス2.5g、グルコース1g、蒸留水1lの組成の基礎培地を用い、pHを5.0及び6.4に調整し、それに亜硝酸濃度($\text{NO}_2\text{-N}$ として計算)として最終的に、0、10、20、50、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように無菌濾過した亜硝酸ナトリウム溶液を添加した。つぎにそれらに前培養した細菌を約 $10^4/\text{ml}$ となるように接種し、 30°C で24時間培養した。増殖の程度は濁度法により660nmの吸光度を測定した値で表した。亜硝酸濃度の違いによる増殖抑制の差は亜硝酸無添加の場合の吸光度を100とした場合と比較して表した。

Table 19 List of strains used in this experiment

| Strains | | Source |
|----------------------------------|-----------|-------------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-24 | Vegetable |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-40 | Vegetable |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | E-2 | Vegetable |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | E-4 | Vegetable |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | E-8 | Vegetable |
| <i>Micrococcus varians</i> | M-4 | Vegetable |
| <i>Bacillus subtilis</i> | B-7 | Vegetable |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | IFO 12060 | |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | L-11 | Fermented pickles |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ML-8 | Fermented pickles |
| <i>Enterococcus faecium</i> | ML-12 | Fermented pickles |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | ML-4 | Fermented pickles |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | ML-5 | Fermented pickles |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | ATCC 8014 | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | L-4 | Fermented pickles |

第2節 結果及び考察

1. 醗酵過程における亜硝酸量、pH、細菌数の変化

醗酵漬物の製造初期には漬液中に亜硝酸の生成が見いだされるが、通常は乳酸醗酵によるpHの低下にともない亜硝酸は消失するのが一般的である。しかし、時に、亜硝酸が過度に生成し、乳酸醗酵が円滑に進行しない場

合がある。Fig. 15は正常に醗酵が進行した場合のpH及び亜硝酸濃度の変化について示したもので、亜硝酸濃度は醗酵開始後1日後に $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度として、約 $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ に達したが、2日後以降は急速に減少した。また、pHは開始時は6.2であったが、乳酸の生成により2日後には4.2となり、4日後には4.0以下となった。同様に、Fig. 16はその際の細菌の挙動について調べた結果であるが、醗酵が正常に進行した場合は、乳酸菌数は急速に増殖し2日後には $10^8/\text{ml}$ に達した。また、亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌数は2日後に $10^6/\text{ml}$ に達したが、それ以降は急激に減少し、4日後にはほとんど検出されなくなった。

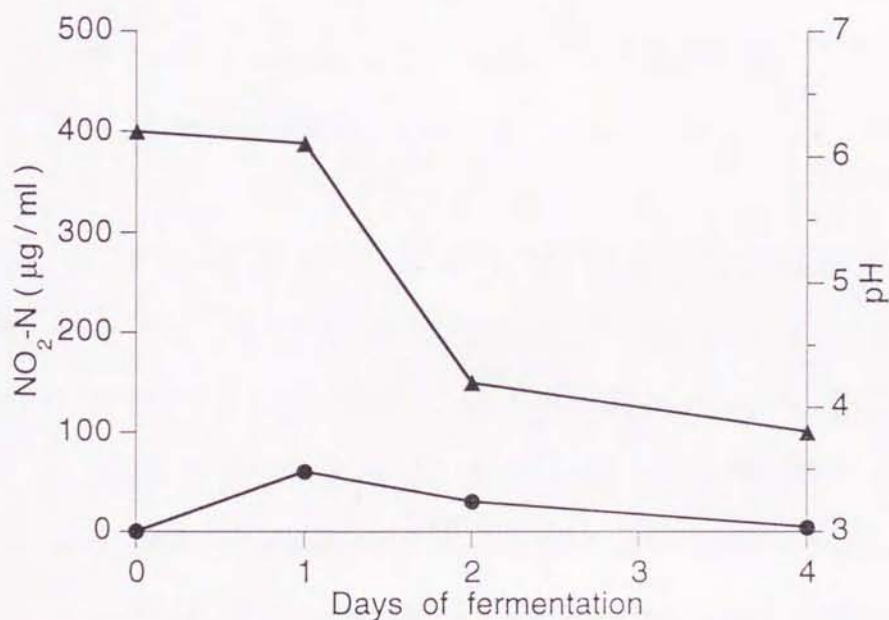


Fig. 15 Changes of pH and $\text{NO}_2\text{-N}$ concentration in the brine during ideal fermentation of turnips at 20°C

● : $\text{NO}_2\text{-N}$ concentration ▲ : pH

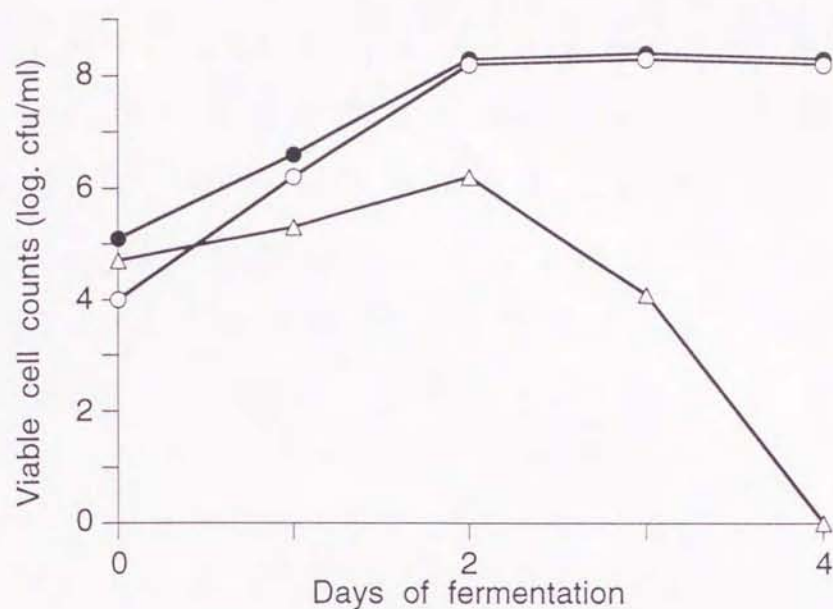


Fig. 16 Population changes in lactic acid bacteria and Gram-negative bacteria in the brine during ideal fermentation of turnips at 20°C

● : total bacteria ○ : Lactic acid bacteria
 △ : Gram-negative bacteria

つぎは亜硝酸が過度に蓄積したために、乳酸醗酵が円滑に進行せず、異常醗酵を起こした場合のpH及び亜硝酸濃度の変化をFig. 17に示した。図からも明らかなように、亜硝酸濃度は急速に増加し、1日後に約 $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、4日後には最高の $420 \mu\text{g}/\text{ml}$ に達した。それ以降は徐々に減少したが、8日後においても $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ の亜硝酸が残存していた。pHは徐々に低下する傾向を示したが、2日後は6.2、4日後は6.0にとどまり、8日

後で漸く5.0以下となった。同様に、細菌の挙動について調べた結果がFig.18で、グラム陰性細菌数は開始時からやや多く、 $10^5/\text{ml}$ あり、2日後は $10^8/\text{ml}$ に達した。それ以降も醗酵が正常な場合のような急激な減少は見られず、6日後から徐々に減少し始め、8日後になって $10^4/\text{ml}$ 以下になった。また、乳酸菌は2日後になっても $10^8/\text{ml}$ には達せず、その後も $10^7/\text{ml}$ レベルで推移した。

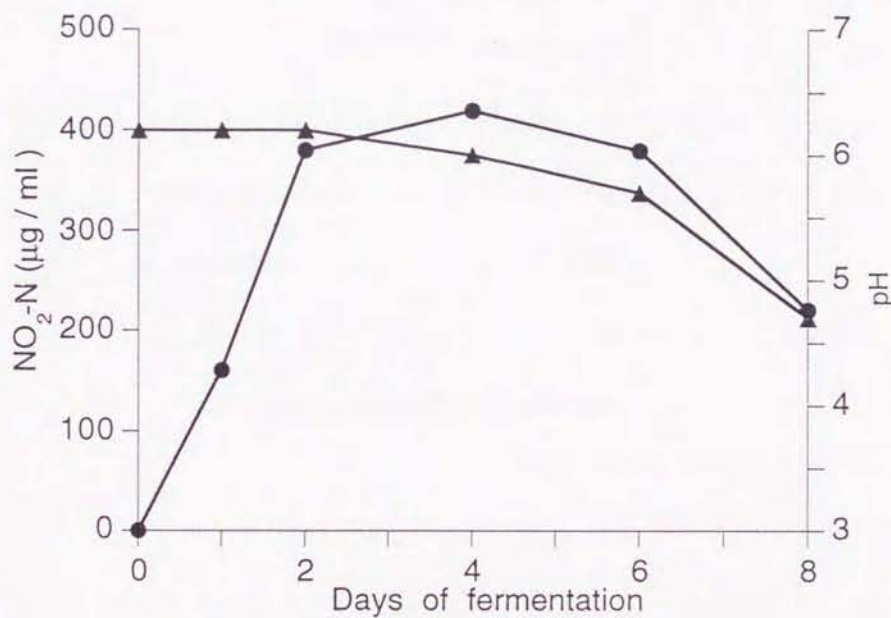


Fig. 17 Changes of pH and NO₂-N concentration in the brine during undesirable fermentation of turnips at 20°C

● : NO₂-N concentration ▲ : pH

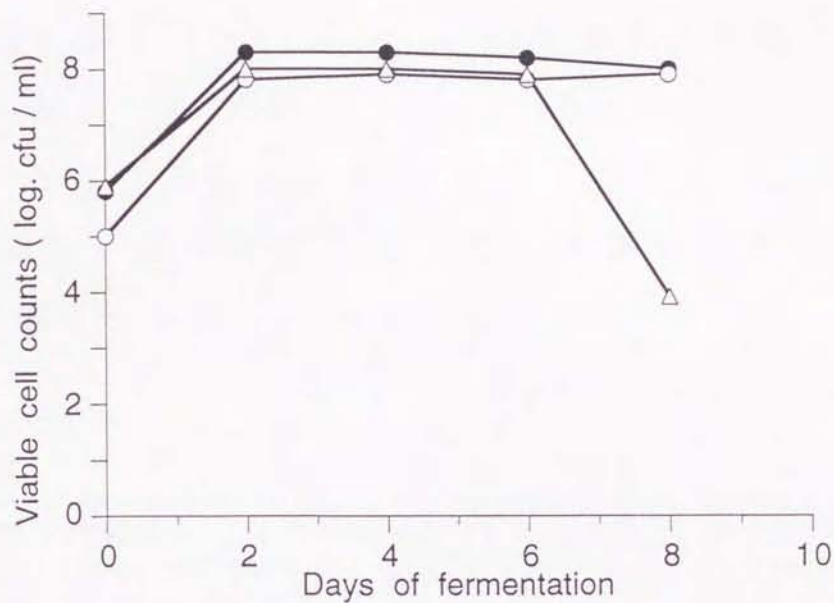


Fig. 18 Population changes in lactic acid bacteria and Gram-negative bacteria in the brine during undesirable fermentation of turnips at 20°C

● : total bacteria ○ : Lactic acid bacteria
 △ : Gram-negative bacteria

醗酵が正常に進行した場合と亜硝酸の蓄積により、異常醗酵となったものの各細菌群の菌数変化については既に述べた。そこで、つぎにそれぞれの場合の菌叢の変化について調べたものがFig. 19、Fig. 20である。

醗酵が正常に進行した場合はFig. 19にしめすとおりであるが、製造開始時には *Pseudomonas* 属菌が主要菌

であったが、1日経過後は*Lactobacillus*属菌が優勢菌となった。一方、醗酵異常を起こした漬物の場合はFig. 20に示す通りである。すなわち、醗酵開始時は*Micrococcus*属菌や*Pseudomonas*属菌が主要菌であるが、2、4日後にはEnterobacteriaceaeに属する細菌が優勢となり、8日後になって、ようやく*Lactobacillus*属菌が優勢菌となるなど、亜硝酸が菌叢の変化に大きな影響を及ぼしていることがわかった。

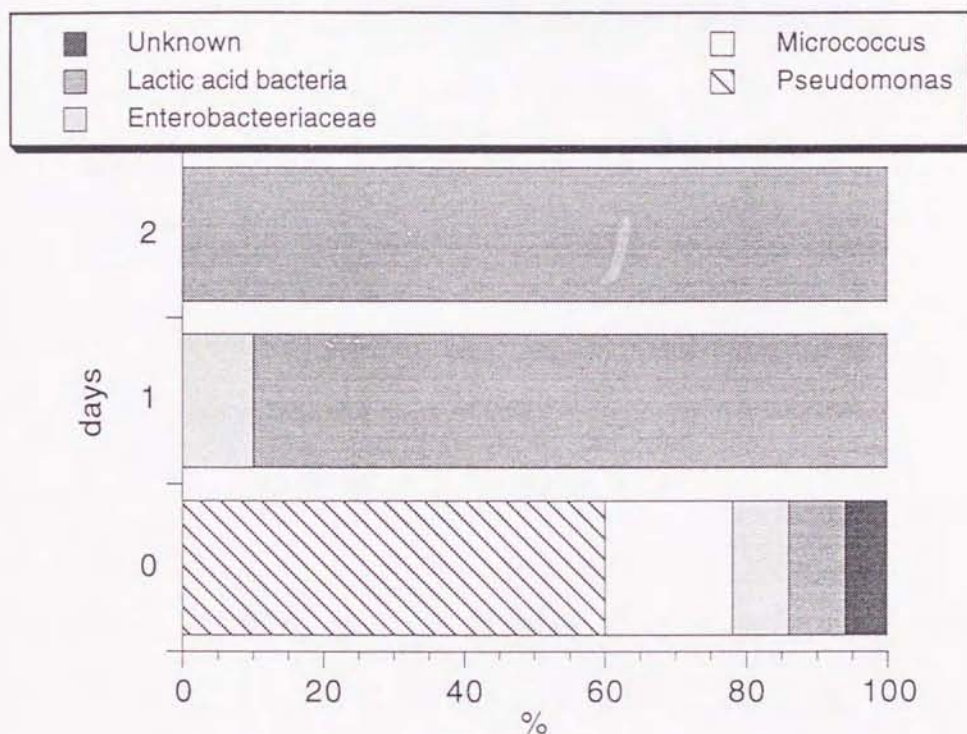


Fig. 19 Changes in microflora in the brine during the ideal fermentation of pickling turnips at 20°C

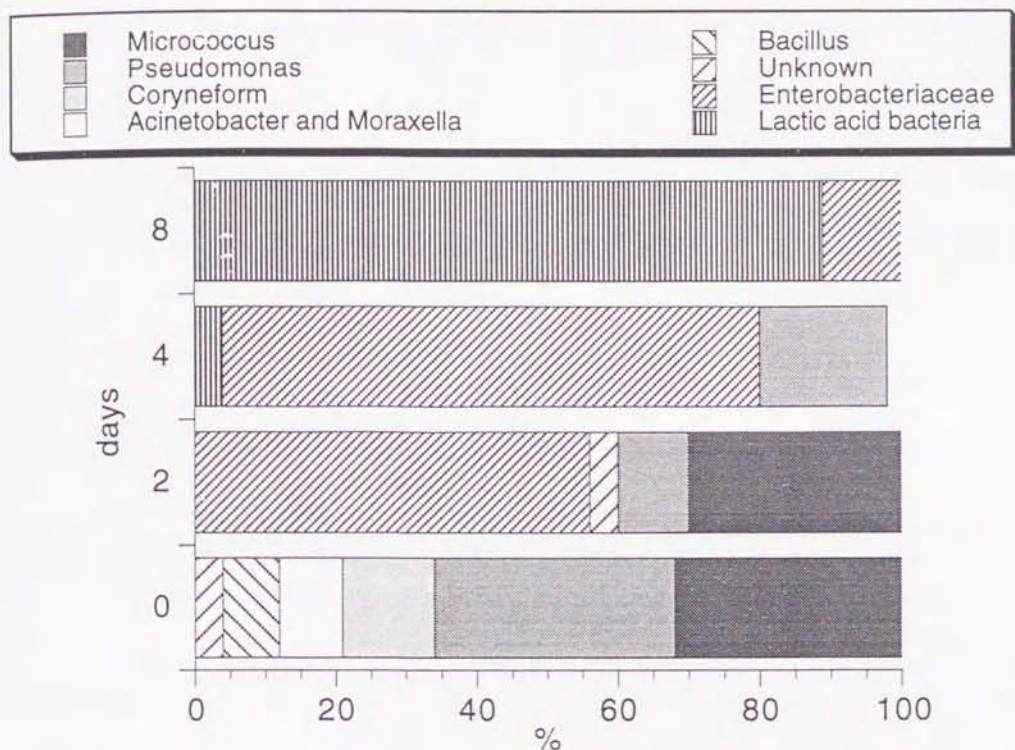


Fig. 20 Changes in microflora in the brine during the undesirable fermentation of pickling turnips at 20°C

2. 原料野菜の亜硝酸生成細菌の分布

亜硝酸生成細菌の多くは原料野菜に由来することから、カブに付着している亜硝酸生成細菌の構成菌について調べ、その結果をTable 20に示した。無作為に分離し、同定した186株のうちグラム陽性細菌では *Micrococcus* 属菌が多く分離され、グラム陰性細菌では *Pseudomonas* 属菌、*Flavobacterium* 属菌や *Enterobacteri*

aceaeに属する細菌が多く分離された。また、全分離菌株のうち、28.7%が亜硝酸生成細菌で、*Pseudomonas*属菌とEnterobacteriaceaeに属する細菌が主要菌であった。*Pseudomonas*属菌では55.9%、Enterobacteriaceaeに属する細菌では全ての菌株が亜硝酸生成能を有していた。

Table 20 Distribution of nitrite producing bacteria on the surface of fresh turnips

| Genera or family | Number of nitrite producing bacteria | Number of nitrite not producing bacteria | Percentage of nitrite producing bacteria |
|--|--------------------------------------|--|--|
| <i>Micrococcus</i> | 1 | 45 | 2.6(%) |
| <i>Bacillus</i> | 3 | 3 | 50.0 |
| <i>Coryneform bacteria</i> | 0 | 10 | 0.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | 38 | 30 | 55.9 |
| <i>Alcaligenes</i> | 2 | 6 | 25.0 |
| <i>Acinetobacter</i> and <i>Moraxella</i> | 0 | 7 | 0.0 |
| <i>Flavobacterium</i> | 0 | 22 | 0.0 |
| <i>Xanthomonas</i> | 0 | 16 | 0.0 |
| Enterobacteriaceae | 12 | 0 | 100.0 |
| Total | 56 | 130 | 28.7 |

3. 亜硝酸が各種細菌の増殖に及ぼす影響

漬物原料野菜及び醗酵漬物から分離同定した細菌を主に対象とし、亜硝酸が細菌の増殖に及ぼす影響について検討を加え、その結果をTable 21、Table 22に示した。醗酵開始時のpHが中性付近での増殖に及ぼす影響を調べる目的からpH6.4の状態で見たところ、原料野菜に多く付着しているグラム陰性細菌のなかの*Pseudomonas fluorescens* P-24株とP-40株は亜硝酸濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合においても増殖は抑制されなかった。*Enterobacter aerogenes* E-2株、*E. cloacae* E-4株は亜硝酸の濃度が高まるにつれ、増殖抑制を受ける傾向は見られるが、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜硝酸濃度でも約50%の抑制を受けたに過ぎなかった。醗酵に関連の深い乳酸菌のうち、*Leuconostoc mesenteroides* IFO 12060とL-11株は増殖が抑制される傾向が認められたが、その他の供試乳酸菌はそれほど強い抑制は受けなかった。

つぎに、醗酵初期の状態として、pH5.0での影響についてみたところ*Ps. fluorescens* P-24株およびP-40株は $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で増殖が阻害され、*E. aerogenes* E-2株、*E. cloacae* E-4株および*Klebsiella pneumoniae* E-8株においては $20\mu\text{g}/\text{ml}$ でわずかに増殖が見られたものの $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では増殖は見られなかった。乳酸菌の供試株ではpH6.4の場合と同様、*Leu*

c. mesenteroides IFO 12060とL-11株の増殖が抑制される傾向が認められたが、他の乳酸菌の供試株においては亜硝酸濃度が高くても比較的弱い抑制にとどまった。したがって、以上の各供試菌株の増殖に対する亜硝酸の影響から、低濃度の亜硝酸は醗酵にともなうpHの低下により、漬物中の亜硝酸生成細菌の増殖を強く抑制することが考えられ、醗酵の進行には都合がよいものと考えられる。しかし、過度の亜硝酸は中性域で亜硝酸生成細菌にはそれほど影響を与えないが、乳酸菌などの増殖に影響を与えるものと考えられ、したがって、pHの低下が遅延し、醗酵が正常に進行しないものと考えられる。

Table 21 Effect of nitrite on the growth of bacteria related
to fermented vegetables at pH6.4 at 20°C

| Strains | | NO ₂ -N μ g/ml | | | | |
|----------------------------------|----------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | 0 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-24 | 100 | 104 | 105 | 108 | 112 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-40 | 100 | 98 | 97 | 98 | 102 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | E-2 | 100 | 108 | 104 | 54 | 50 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | E-4 | 100 | 103 | 94 | 60 | 48 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | E-8 | 100 | 102 | 98 | 96 | 69 |
| <i>Micrococcus varians</i> | M-4 | 100 | 82 | 66 | 62 | 43 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | B-7 | 100 | 75 | 52 | 43 | 29 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | IFO12060 | 100 | 44 | 38 | 30 | 21 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | L-11 | 100 | 40 | 36 | 28 | 20 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | ML-8 | 100 | 86 | 69 | 52 | 32 |
| <i>Streptococcus faecium</i> | ML-12 | 100 | 94 | 92 | 83 | 62 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | ML-4 | 100 | 88 | 82 | 73 | 59 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | ML-5 | 100 | 92 | 90 | 54 | 38 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | ATCC8014 | 100 | 100 | 87 | 78 | 63 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | L-4 | 100 | 88 | 84 | 62 | 29 |

Growth ratio=(OD₆₆₀/OD₆₆₀ NO₂ 0 μ g/ml)×100. Growth ratio was measured after 24h incubation

Table 22 Effect of nitrite on the growth of bacteria related
to fermented vegetables at pH 5.0 at 20°C

| Strains | | NO ₂ -N μ g./ml | | | | |
|----------------------------------|----------|--------------------------------|----|----|----|-----|
| | | 0 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-24 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | P-40 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | E-2 | 100 | 99 | 36 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | E-4 | 100 | 78 | 6 | 0 | 0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | E-8 | 100 | 72 | 31 | 0 | 0 |
| <i>Micrococcus varians</i> | M-4 | 100 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | B-7 | 100 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | IFO12060 | 100 | 10 | 8 | 5 | 0 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | L-11 | 100 | 9 | 7 | 5 | 2 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ML-8 | 100 | 51 | 16 | 0 | 0 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | ML-12 | 100 | 58 | 37 | 18 | 0 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | ML-4 | 100 | 91 | 90 | 67 | 9 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> | ML-5 | 100 | 92 | 81 | 30 | 7 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | ATCC8014 | 100 | 86 | 72 | 43 | 22 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | L-4 | 100 | 87 | 78 | 45 | 29 |

Growth ratio = $(OD_{.660} / OD_{.660} \text{ NO}_2 \text{ } 0 \mu\text{g./ml}) \times 100$,

Growth ratio was measured after 24h incubation.

第3節 要 約

醃酵漬物において、亜硝酸の蓄積により正常な醃酵が進行せず、pHの低下が遅延する原因について検討を加えた。亜硝酸の蓄積の原因と考えられる亜硝酸生成細菌の挙動を調べた結果、原料野菜に付着している細菌のうち、28.7%のものが亜硝酸生成能を有しており、特に、*Pseudomonas*属菌や*Enterobacteriaceae*に属する細菌が主要な亜硝酸生成細菌であった。つぎに、原料野菜や醃酵漬物から分離した細菌を対象に亜硝酸が細菌の増殖に及ぼす影響について調べたところ、*Pseudomonas*属菌や*Enterobacter*属菌は醃酵がある程度進行したpH5.0近辺においては亜硝酸が共存すると増殖は抑制される傾向が見られたが、醃酵開始時におけるpH6.4近辺においてはほとんど抑制されなかった。一方、乳酸菌の増殖に対する亜硝酸の影響をみたところ、醃酵初期に出現する*Leuconostoc*属菌の増殖が抑制されやすい傾向が認められた。したがって、漬物製造開始時において、原料野菜に由来する亜硝酸生成細菌、なかでも、*Pseudomonas*属菌や*Enterobacter*属菌などが通常と異なり、急速に増殖した場合、過度の亜硝酸が生成されて、初期に出現する*Leuconostoc*属菌などの球状乳酸菌の増殖が抑制され、そのために乳酸の生成にともなうpHの低下が遅延し、異常醃酵を起こすものと判断した。