

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

前章において、カブの醗酵漬物が正常に醗酵せず、pHの低下が遅延する事例について検討を行ない、それは醗酵初期において *Pseudomonas* 属菌や *Enterobacter* 属菌などによる過度の亜硝酸の生成によって、乳酸菌の増殖が抑制されたことに起因することや細菌の増殖に及ぼす亜硝酸の影響が菌種やpHにより異なることを明らかにした。亜硝酸の細菌に対する増殖阻害に関しては肉製品の保存との関連から *Clostridium perfringens*^{65,66)} や *Clostridium botulinum*^{67,68)} など食中毒菌を対象とした報告が主で、醗酵漬物に関する微生物を対象とした報告例はほとんど見当たらない。そこで、本章においては、醗酵漬物に由来する細菌を対象に亜硝酸による細菌の死滅促進に及ぼす影響について検討を加えた。

第 1 節 方 法

1. 漬物の調製

漬物の原料野菜としては、実験の都合上、亜硝酸の生

成が比較的少ないものとしてキャベツを用いた。それらの約5kgを良く水洗した後、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3%の食塩水で野菜重量の半量の差し水をした。一晚、室温で荒漬けし、軽く洗浄した後、同重量の3%食塩水を加え本漬けとし、20℃で醗酵を行なった。キャベツの醗酵における亜硝酸の影響をみる際は、醗酵開始1日後に漬け液での亜硝酸濃度が $50\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように亜硝酸ナトリウム溶液を添加した。良く攪拌した漬け液を必要な時に採取し、測定に供した。

2. 細菌数の測定

培養液及び漬物の漬け液をそれぞれ1mlまたは10ml採取し、常法どおり10倍段階希釈法により標準寒天培地を使用し、生菌数を測定した。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を計数し、本菌数とした。乳酸菌の計数は第3章にしたがい、選択計数培地として*Leuconostoc*属菌はPES培地、*Enterococcus*及び*Pediococcus*属菌はM-*Enterococcus*培地（BBL）、*Lactobacillus*属菌はM-LBS（BBL）培地を用いて行なった。

3. 亜硝酸の定量及びpHの測定

漬け液中の亜硝酸の定量及びpHの測定は第5章に示した方法に準拠して行なった。

4. 亜硝酸による死滅促進の検討

供試菌株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8菌株、*Micrococcus varians* M-4、*Pseudomonas fluorescens* P-24、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Klebsiella pneumoniae* E-8、*Enterococcus faecalis* ML-8、*Leuconostoc mesenteroides* L-11、*Pediococcus pentosaceus* ML-4、*Lactobacillus plantarum* L-4を用いた。前培養はトリプチケースペプトン5g、酵母エキス2.5gブドウ糖1g、蒸留水1lの組成の培地（pH6.4）を用いて行なった。醗酵がやや進行している状態としてpHを5.0に、かなり進行している状態としてpHを4.0に調整した同じ組成の培地に $\text{NO}_2\cdot\text{N}$ として最終濃度が0、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように無菌的に濾過した亜硝酸ナトリウム溶液を添加した。それらの培地に被験菌の初発菌数が各々 $10^6/\text{ml}$ となるよう接種し、30℃で3日間培養した。その間、経時的に生残菌数を計数することにより亜硝酸の影響をみた。

5. *Enterobacter aerogenes* E-2株と *Leuc. mesenteroides* L-11株及び *Lact. plantarum* L-4株との混合培養

硝酸カリウム存在下における *Enterobacter aerogenes* E-2株と *Leuc. mesenteroides* L-11株あるいは *Lact. plantarum* L-4株との混合培養において各菌株の初発菌数を変化させた場合の *Leuc. mesenteroides* L-11株及び *L. plantarum* L-4株の生菌数の変化に及ぼす影響について検討を加えた。すなわち、*Enterobacter aerogenes* E-2株の初発菌数が *Leuc. mesenteroides* L-11株よりも少ない場合はそれぞれ $5.0 \times 10^3 / \text{ml}$ 、 $8.0 \times 10^5 / \text{ml}$ 、多い場合はそれぞれ $5.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 、 $2.0 \times 10^2 / \text{ml}$ となるよう試験培地に接種し、 30°C で4日間培養し、その間の生菌数の変化を調べた。同様に、*Enterobacter aerogenes* E-2株の初発菌数が *L. plantarum* L-4株よりも少ない場合はそれぞれ $5.0 \times 10^3 / \text{ml}$ 、 $8.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 、多い場合はそれぞれ $2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 、 $8.0 \times 10^3 / \text{ml}$ となるよう試験培地に接種し、調べた。試験培地としては *Enterobacter aerogenes* E-2株による亜硝酸の生成が可能なように前述の培地に硝酸カリウム0.5%を添加し、亜硝酸濃度 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $\text{pH} 6.4$ に調整したものを用了。生菌数の計数は *Enterobacter aerogenes*

E-2株はマッコンキー培地（栄研）、*Leu.mesenteroides* L-11株はPES培地、*Lact.plantarum* L-4株はM-LBS培地により行なった。

第2節 結果及び考察

1. 醗酵漬物の細菌叢に及ぼす亜硝酸の影響

前章で、正常に醗酵が進行した場合には、醗酵初期のpHが5.0近辺になり、10～20 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度の亜硝酸の存在下で*Pseudomonas*属菌や*Enterobacter*属菌の増殖が抑制されることを明らかにしてきた。そこで、醗酵開始後、pHが約5.0となる1日後に漬け液の亜硝酸濃度が50 $\mu\text{g/ml}$ となるように亜硝酸ナトリウム溶液を添加し、その後の各細菌数の変化に及ぼす影響について調べた結果をFig. 21に示した。

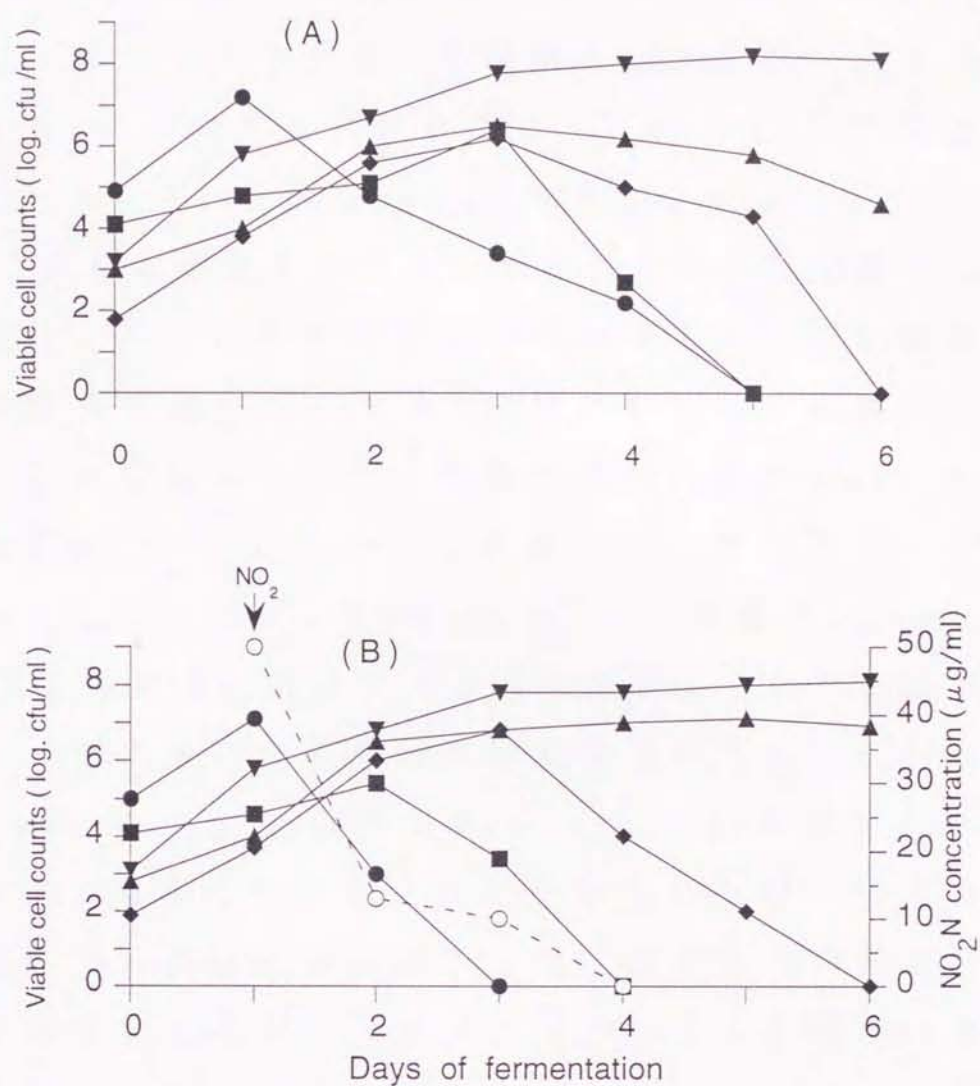


Fig. 21 Effect of nitrite on the microfloral change during fermentation of pickling cabbages at 20 °C

● : Gram negative bacteria ■ : *Enterococcus*

◆ : *Leuconostoc* ▲ : *Pediococcus*

▼ : *Lactobacillus*

○ : NO₂-N concentration (μg/ml)

(A) : Control (ideal fermentation)

(B) : NO₂ added (NaNO₂ was added to the brine at 50 μg/ml of NO₂-N in the brine)

なお、本実験では原料野菜としてキャベツを用いたが、これはキャベツからの亜硝酸生成が少ないためで対照の (A) における亜硝酸生成は $5 \mu\text{g/ml}$ 以下にとどまっていた。*Pseudomonas* 属菌や *Enterobacteriaceae* に属する細菌が多くを占めるグラム陰性細菌は正常な場合 (A)、5 日後でほとんど死滅するが、亜硝酸が低濃度存在する場合 (B) では3日後に死滅し、死滅が促進されることが認められた。乳酸菌においては *Lactobacillus* 属菌や *Pediococcus* 属菌に対してはあまり影響はみられなかったが、*Enterococcus* 属菌や *Leuconostoc* 属菌は死滅が促進される傾向が認められた。前章において、亜硝酸による増殖抑制効果は *Leuconostoc* 属菌 $>$ *Enterococcus* 属菌 $>$ *Pediococcus* 属菌 $>$ *Lactobacillus* 属菌 の順に強いことを報告したが、死滅の場合においても同様の傾向を示した。漬け液中の亜硝酸は醗酵の進行にしたがい、急速に減少し、4 日後にはほとんど検出されなくなった。

2. 漬物由来細菌の死滅に及ぼす亜硝酸の影響

漬物原料野菜及び醗酵漬物から分離同定した細菌を対象とし、亜硝酸が細菌の死滅に及ぼす影響について検討を加え、亜硝酸生成細菌に関しては Fig. 22 に、乳酸菌に関しては Fig. 23 に結果を示した。亜硝酸生成細菌においては醗酵初期の状態として pH 5.0 での影響について、

みたところ、亜硝酸が無添加の場合はいずれも増殖がみられたが、亜硝酸が存在する場合には *Ps. fluorescens* P-24株は $5 \mu\text{g/ml}$ 、*K. pneumoniae* E-8株は $10 \mu\text{g/ml}$ 、*M. varians* M-4株は $20 \mu\text{g/ml}$ 、*Enterobacter aerogenes* E-2株は $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で死滅し、死滅の速度は濃度が高まるにつれ速くなった。乳酸菌の場合、醗酵が進行しつつある状態として pH 4.0での影響についてみたところ、*Enterococcus faecalis* ML-8株は亜硝酸が無添加の場合においても増殖は見られず、減少する傾向が見られたが、亜硝酸が $10 \mu\text{g/ml}$ 以上存在すると急速に死滅が促進された。

Enterococcus faecalis ML-8株以外では、亜硝酸が無添加の場合いずれもが増殖したが *Leu. mesenteroides* L-11株は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上で死滅し、*P. pentosaceus* ML-4株及び *Lact. plantarum* L-4株は $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で死滅した。なお、*P. pentosaceus* ML-4株は $20 \mu\text{g/ml}$ では減少傾向を示したのに対し、*Lact. plantarum* L-4株はやや増殖傾向が見られたことから、亜硝酸の本研究で供試した漬物由来乳酸菌に対する死滅促進効果は *Enterococcus*属菌 > *Leuconostoc*属菌 > *Pediococcus*属菌 > *Lactobacillus*属菌の順に大きかった。このような傾向は醗酵漬物における微生物叢の変遷と同様な傾向を示しており、微生物叢の変遷に pH や食塩濃度の他に亜硝酸の影響があることを示唆している。

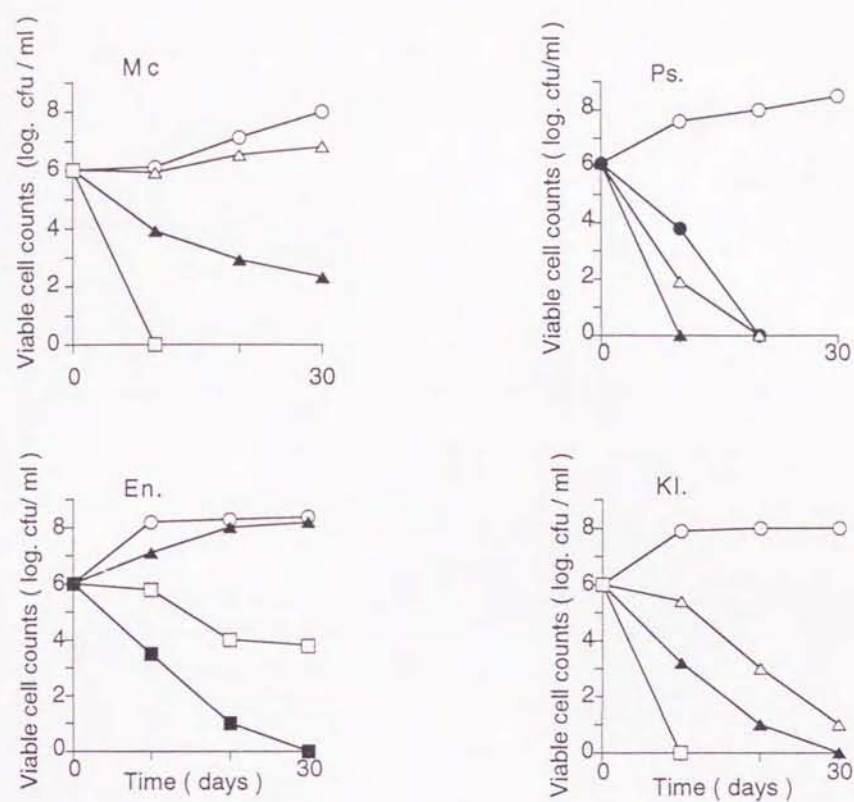


Fig. 22 Effect of nitrite on the viable counts of bacteria isolated from fermented pickles at pH 5.0 at 30°C

○ : NO ₂ -N	0 µg/ml	▲ : NO ₂ -N	20 µg/ml
● : NO ₂ -N	5 µg/ml	□ : NO ₂ -N	50 µg/ml
△ : NO ₂ -N	10 µg/ml	■ : NO ₂ -N	100 µg/ml

Mc. : *Micrococcus varians* M-4

Ps. : *Pseudomonas fluorescens* P-24

En. : *Enterobacter aerogenes* E-2

Kl. : *Klebsiella pneumoniae* E-8

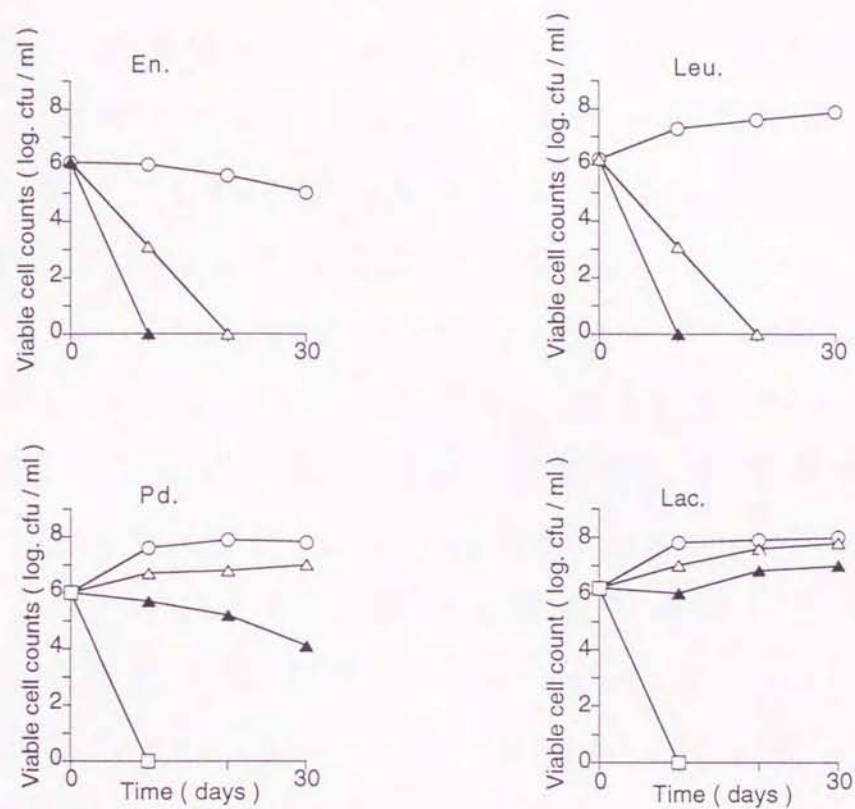


Fig. 23 Effect of nitrite on the viable counts of bacteria isolated from fermented pickles at pH4.0 at 30°C

○ : $\text{NO}_2\text{-N}$ 0 $\mu\text{g/ml}$ ▲ : $\text{NO}_2\text{-N}$ 20 $\mu\text{g/ml}$
 △ : $\text{NO}_2\text{-N}$ 10 $\mu\text{g/ml}$ □ : $\text{NO}_2\text{-N}$ 50 $\mu\text{g/ml}$

En. : *Enterococcus faecalis* ML-8

Leu. : *Leuconostoc mesenteroides* L-11

Pd. : *Pediococcus pentosaceus* ML-4

Lac. : *Lactobacillus plantarum* L-4

3. *Enterobacter aerogenes* E-2株と*Leuconostoc mesenteroides* L-11株及び*Lactobacillus plantarum* L-4株との混合培養

過度の亜硝酸生成の一因が、亜硝酸生成菌の*Pseudomonas*属菌や*Enterobacter*属菌が原料野菜に比較的多く付着し、それらが増殖することに起因することを第5章で明らかにした。そこで、硝酸カリウム存在下における*Enterobacter aerogenes* E-2株と*Leuc. mesenteroides* L-11株あるいは*Lact. plantarum* L-4株との混合培養において各菌株の初発菌数を変化させた場合の*Leuc. mesenteroides* L-11株及び*Lact. plantarum* L-4株の生菌数の変化に及ぼす影響について検討を加えた。*Leuc. mesenteroides* L-11株と*Enterobacter aerogenes* E-2株の混合培養の結果はFig. 24に示すとおりである。*Leuc. mesenteroides* L-11株が*Enterobacter aerogenes* E-2株よりも生菌数が多く、亜硝酸が $100 \mu\text{g/ml}$ 存在しているとpHの低下はやや遅れるが、生菌数の変化は無添加の場合とあまり違いはみられなかった。しかし、*Enterobacter aerogenes* E-2株が多い場合は、亜硝酸無添加区では時間の経過にしたがい、*Leuc. mesenteroides* L-11株は急速に増殖し、*Enterobacter aerogenes* E-2株はpHの低下にともない減少した。一方、亜硝酸添加区では*Leuc. mesenteroides* L-11株は増殖抑制

を受けるとともにpHの低下も抑制されたが、*Enterobacter aerogenes* E-2株は増殖を続け、4日後でも生菌数の低下は認められなかった。

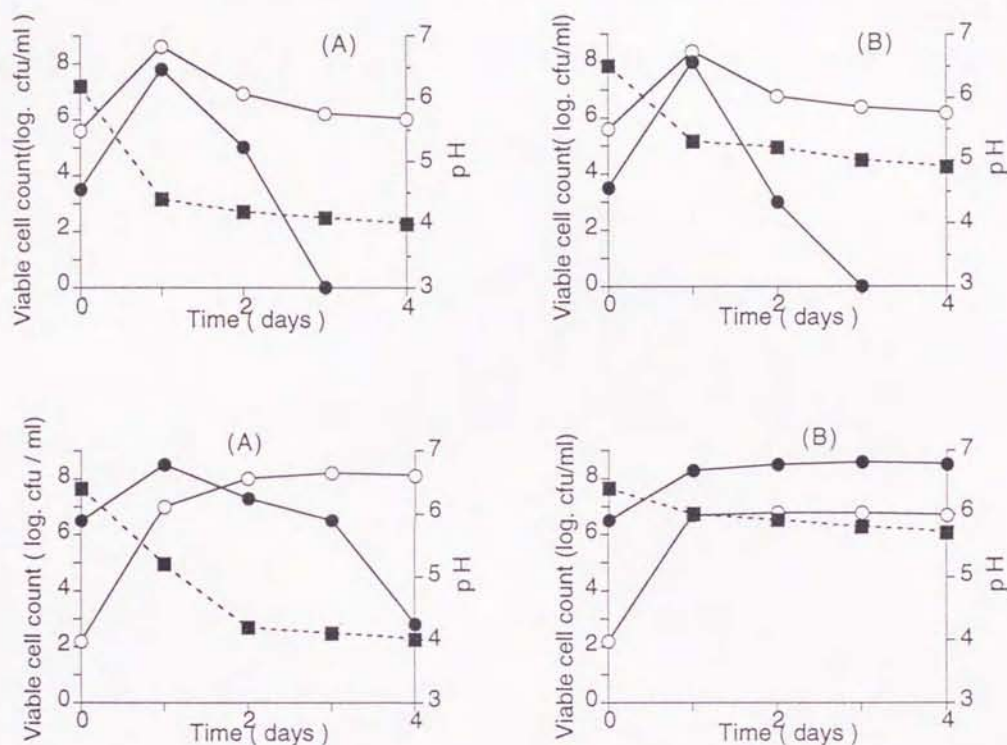


Fig. 24 Effects of the number of *E. aerogenes* and nitrite concentration on the growth of *Leuc. mesenteroides* at 30°C

○ : *Leuconostoc mesenteroides* L-11

● : *Enterobacter aerogenes* E-2

■ : pH

(A) : $\text{NO}_2\text{-N}$ 0 $\mu\text{g/ml}$

(B) : $\text{NO}_2\text{-N}$ 100 $\mu\text{g/ml}$

また、*Lact. plantarum* L-4株と*Enterobacter aerogenes* E-2株の混合培養の結果をFig. 25に示した。両菌の生菌数の変化は*Leuc. mesenteroides* L-11株の場合とほぼ同様な傾向を示した。以上のことは、漬物の醗酵初期に亜硝酸生成細菌の菌数が乳酸菌に比して多く、亜硝酸濃度も高い場合には乳酸菌の増殖が抑制されるとともにpHの低下も抑制されることを裏付けている。

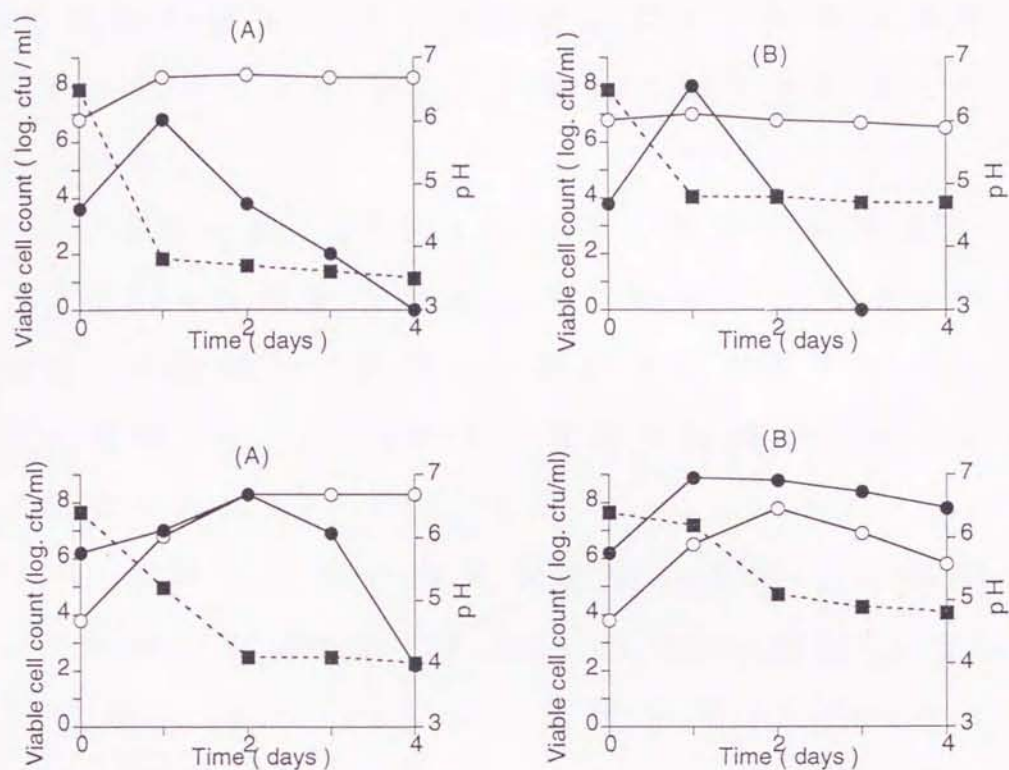


Fig. 25 Effects of the number of *E. aerogenes* and nitrite concentration on the growth of *Lact. plantarum* at 30°C

○ : *Lactobacillus plantarum* L-4

● : *Enterobacter aerogenes* E-2

■ : pH

(A) : $\text{NO}_2\text{-N}$ 0 $\mu\text{g/ml}$

(B) : $\text{NO}_2\text{-N}$ 100 $\mu\text{g/ml}$

第3節 要 約

醗酵漬物の細菌に対する亜硝酸による死滅促進効果について検討を加えたところ、新たに以下の結論を得ることができた。

(1) 醗酵初期 (pH 5.0) に漬け液の亜硝酸濃度を $50 \mu\text{g/ml}$ に調整したところ、対照よりもグラム陰性細菌は早く死滅し、供試した乳酸菌のなかでは *Enterococcus* 属菌と *Leuconostoc* 属菌の死滅が促進される傾向が認められた。

(2) 供試した亜硝酸生成細菌は酸性下で亜硝酸によって死滅が促進され、*Pseudomonas* 属菌 > *Klebsiella* 属菌 > *Micrococcus* 属菌 > *Enterobacter* 属菌の順に大きな影響を受けた。供試した乳酸菌に対する亜硝酸の死滅促進は *Enterococcus* 属菌 > *Leuconostoc* 属菌 > *Pediococcus* 属菌 > *Lactobacillus* 属菌の順に大きいことが明らかとなった。

(3) *E. aerogenes* E-2 株と *Leuc. mesenteroides* L-11 株及び *Lact. plantarum* L-4 株との混合培養の結果、亜硝酸生成細菌の菌数が乳酸菌に比して多く、亜硝酸濃度も高い場合には乳酸菌の増殖及び pH の低下が抑制された。

第 7 章

醃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

5章において、過度の亜硝酸の生成によって醃酵漬物が正常に醃酵しない例を見いだし、亜硝酸の存在下ではpHの違いによって、細菌の増殖促進や抑制が生じることを明らかにし、6章では亜硝酸が存在する酸性下においては亜硝酸生成細菌及び乳酸菌の死滅が促進されることを明らかにした。醃酵初期における亜硝酸の蓄積は*Pseudomonas*属菌や*Enterobacter*属菌などの亜硝酸生成細菌が有している硝酸還元酵素の働きで、漬物原料野菜に多く含まれている硝酸が還元されることによる。したがって、亜硝酸の蓄積は亜硝酸生成細菌の増殖や硝酸還元酵素活性に大きく左右されることが考えられる。醃酵漬物は一定の食塩濃度と温度の下で製造されることから、亜硝酸生成細菌の増殖及び硝酸還元酵素活性はそれらの環境要因に大きく影響を受けることが考えられる。そこで、本章においては醃酵漬物に由来する亜硝酸生成細菌及びそれらの硝酸還元酵素を対象に環境要因が亜硝酸の生成に及ぼす影響について検討を加えた。

第1節 方 法

1. 供試菌株及び細菌の増殖測定

供試菌株は漬物原料野菜及び醃酵漬物より当研究室において分離同定した保存菌株 (*Pseudomonas fluorescens* P-24、*Pseudomonas fluorescens* P-40、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4、*Klebsiella pneumoniae* E-8) で、醃酵漬物を製造する際に出現する亜硝酸生成細菌のうち主要なものを用いた。前培養はトリプチケースペプトン5g、酵母エキス2.5g、ブドウ糖1g、蒸留水1l、pH6.4の培地を用いて行なった。細菌の増殖の変化は分光光度計 (島津、UV-160A) を用いて、660nmの濁度を測定することにより調べた。

2. 亜硝酸の定量及びpHの測定

細菌の増殖にともなって生成される亜硝酸及び硝酸還元酵素によって生じる亜硝酸の定量は第5章に用いた方法に準拠し、スルファニルアミドでジアゾ化し、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540nmで比色定量することによって行なった⁵⁾。なお、pHは電極法によりpHメーター (東亜電波、モデルHM5

0.1 M) を用いて行なった。

3. 洗浄菌体液の調製

供試菌株の培養液を遠沈して得た菌体を無菌的に0.1 Mのリン酸緩衝液 (pH 7.2) で二度洗浄した。つぎに、洗浄菌体が菌数として $10^8 \sim 10^9 / \text{ml}$ となるように、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、洗浄菌体を得た。

4. 硝酸還元酵素活性の測定

硝酸還元酵素活性の測定はGreenbergらの方法^{6,9)}に準じ、0.05 M硝酸ナトリウム、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.1)、0.05 Mコハク酸ナトリウムに洗浄菌体液を0.2 ml加え、反応液の全量を2 mlとし、通常の場合は30℃で反応を行なわせた。反応時間は食塩及びpHの影響を見る場合は30分、温度の影響を見る場合は4時間、糖の影響を見る場合は4あるいは6時間、有機酸の影響を見る場合は24時間とした。一定時間経過後、1%スルファニルアミド/20%塩酸を添加することによって反応を停止させ、生成した亜硝酸を測定した。なお、pHの影響を見る際は、0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.1) に替え、0.1 Mリン酸緩衝液及び0.1 M McIlvaine緩衝液を用い、pH 4.5 ~ 7.5に反応液を調整した。有機酸及び糖の影響をみる際は、McIlvaine緩衝液中のクエン酸ナトリウムをコハ

ク酸ナトリウムに替え、反応液の0.1%になるよう各有機酸のナトリウム塩及び糖を用いた。また、4時間以上反応させる場合は残存菌、汚染菌の増殖を防ぐ目的から $50\mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリンを反応液に加えた。

第2節 結果及び考察

1. 亜硝酸生成細菌の増殖及び亜硝酸の生成に及ぼす温度、食塩の影響

亜硝酸生成細菌の増殖にともなう亜硝酸の生成に及ぼす温度の影響について検討を加えた結果がTable 23である。24時間培養後の増殖濁度と蓄積された亜硝酸濃度を示した。低温細菌の一種である *Ps. fluorescens* P-24、P-40株は $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で最も増殖が活発で、亜硝酸の生成も $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ で多かった。 40°C ではほとんど増殖がみられず、亜硝酸の蓄積も認められなかった。一方、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4、*K. pneumoniae* E-8株は $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で最も増殖が活発で、亜硝酸の蓄積も $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ で多かった。 10°C では増殖も亜硝酸の蓄積もほとんどみられなかった。このことは、 10°C 以下の低温域での醗酵漬物においては亜硝酸生成の主要菌が *Pseudomonas* 属菌となり、 20°C 前後の中温域での醗酵漬物の亜硝酸生成の主要菌は *Pseudomonas* 属菌に加えて *Ent*

erobacter 属菌や *Klebsiella* 属菌となる可能性の高いことを示しているが、実際の低塩漬物においても低温から中温域で保存される漬物には *Pseudomonas* 属や *Enterobacteriaceae* に属する細菌が出現しやすい傾向が認められる⁷⁰⁾。

Table 23 Effects of temperature on the nitrite accumulation by nitrite producing bacteria

Strains		Growth (O.D. at 660nm)					Nitrite (NO ₂ -N μ g/ml)				
		5	10	20	30	40°C	5	10	20	30	40°C
<i>Ps. fluorescens</i>	P-24	0.02	0.06	0.27	0.21	0.02	0	25	645	482	0
<i>Ps. fluorescens</i>	P-40	0.04	0.06	0.27	0.30	0.02	0	22	398	469	0
<i>E. aerogenes</i>	E-2	0.02	0.03	0.27	0.32	0.30	0	0	464	818	691
<i>E. cloacae</i>	E-4	0.02	0.04	0.33	0.41	0.35	0	0	586	1091	803
<i>K. pneumoniae</i>	E-8	0.02	0.02	0.24	0.41	0.36	0	0	571	994	1290

Growth and nitrite concentration were measured after 24h of incubation

つぎに、醗酵漬物の製造に重要な食塩の影響について調べた結果が Table 24 である。*Ps. fluorescens* P-24、P-40 株のいずれの菌株も食塩の存在しない条件下で増殖、亜硝酸の生成とも最高で、4%以上の食塩が存在すると増殖は阻害され亜硝酸もほとんど生成されなかった。*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4 及び *K. pneumoniae* E-8 株は食塩非存在下よりもむしろ 1~2%の食塩存在下で増殖及び亜硝酸生成が多い傾向が認められ、6%の食塩存在下でも増

殖と亜硝酸生成がみられた。一般の漬物と異なり2～3%前後の低塩下で製造される醃酵漬物や浅漬に亜硝酸が多く認められる⁷¹⁾ こととも一致している。

Table 24 Effects of NaCl on the nitrite accumulation by nitrite producing bacteria

		Growth (O.D. at 660nm)					Nitrite (NO ₂ -N μg/ml)				
Strains		0	1	2	4	6	0	1	2	4	6NaCl%
<i>Ps. fluorescens</i>	P-24	0.20	0.16	0.07	0.01	0.00	463	181	15	0	0
<i>Ps. fluorescens</i>	P-40	0.23	0.22	0.11	0.01	0.00	452	326	122	12	0
<i>E. aerogenes</i>	E-2	0.26	0.25	0.24	0.08	0.04	734	795	769	389	92
<i>E. cloacae</i>	E-4	0.35	0.35	0.37	0.23	0.05	846	982	980	656	74
<i>K. pneumoniae</i>	E-8	0.33	0.35	0.35	0.28	0.05	786	823	859	622	12

Growth and nitrite concentration were measured after 24h of incubation at 30°C

2. 硝酸還元酵素活性に及ぼす温度及び食塩濃度の影響

硝酸還元酵素自体の活性に及ぼす温度の影響について調べた結果をFig. 26およびFig. 27に示した。いずれの菌株においても温度が上昇するに従い酵素活性は急激に高くなる傾向が認められた。食塩の影響を調べた結果をFig. 28に示した。*Ps. fluorescens* P-24、P-40株のいずれの菌株も食塩濃度が高まるにつれ酵素活性は急激に低下した。一方、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4及び*K. pneumoniae* E-8株の酵素活性は*Ps. fluorescens* P-24、

P-40株ほど大きな食塩の影響を受けなかった。したがって、硝酸還元活性に及ぼす食塩濃度の影響は増殖にともなう亜硝酸の蓄積に及ぼす影響とほぼ同様な傾向を示すものと考えられた。

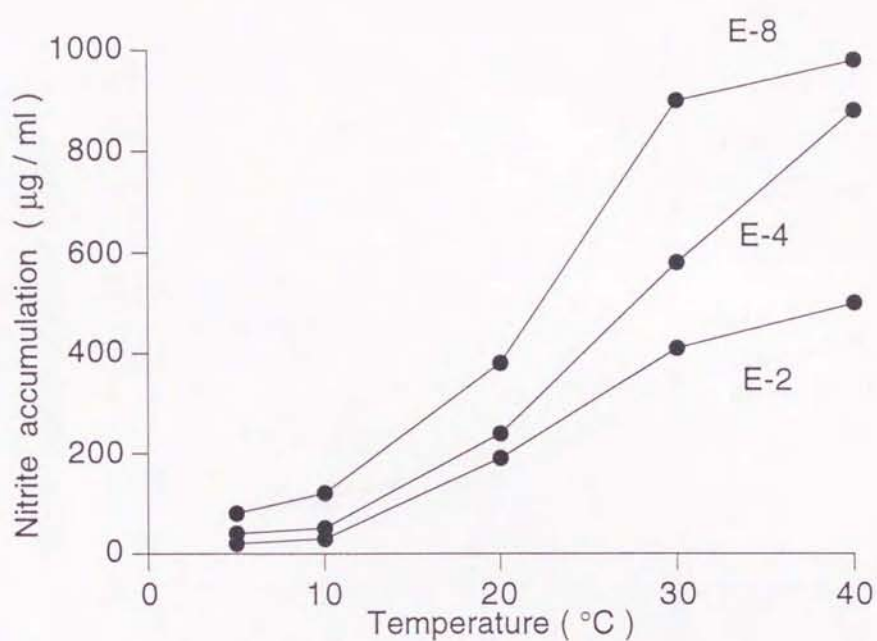


Fig. 26 Effects of temperature on the nitrate reductase activity of bacteria isolated from fermented pickles

Reaction mixture contained 0.05M NaNO_3 , 0.05M Na-Succinate, 0.1M Phosphate buffer (pH 7.1), cell suspension and 50 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline.

Nitrite accumulation was measured after reaction for 4hr.

E-2 : *Enterobacter aerogenes* E-2

E-4 : *Enterobacter cloacae* E-4

E-8 : *Klebsiella pneumoniae* E-8

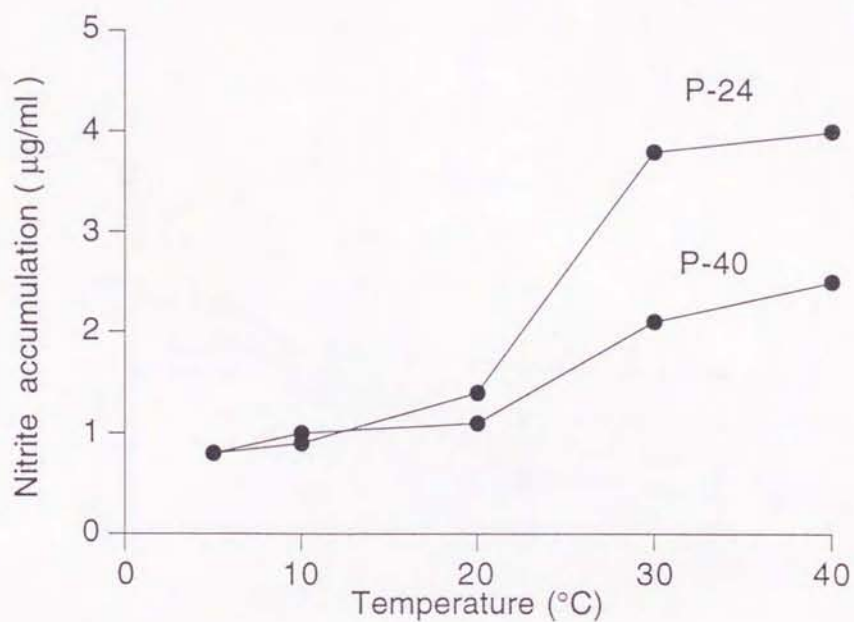


Fig. 27 Effects of temperature on the nitrate reductase activity of bacteria isolated from fermented pickles

Reaction mixture contained 0.05M NaNO_3 , 0.05M Na-Succinate, 0.1M Phosphate buffer (pH 7.1), cell suspension and 50 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline.

Nitrite accumulation was measured after reaction for 4hr.

P-24 : *Pseudomonas fluorescens* P-24

P-40 : *Pseudomonas fluorescens* P-40

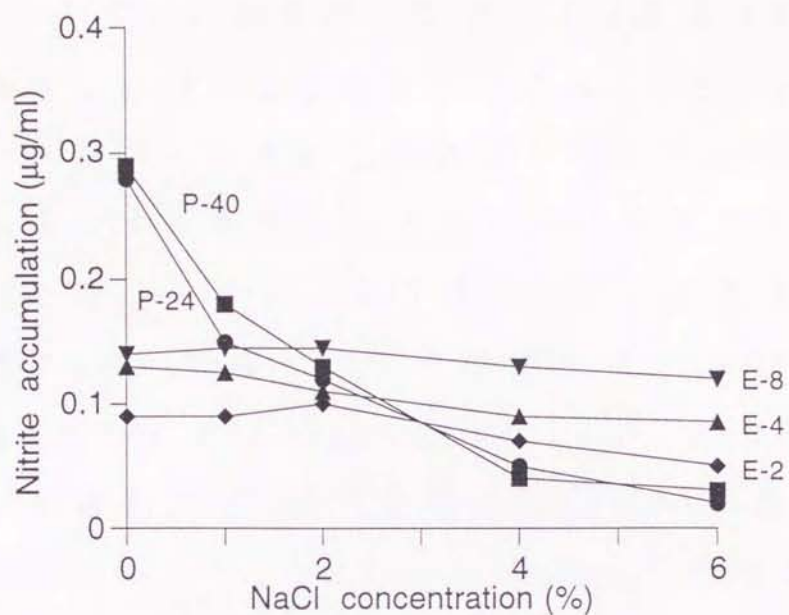


Fig. 28 Effects of NaCl on the nitrate reductase activity of bacteria isolated from fermented pickles

Reaction mixture contained 0.05M NaNO_3 , 0.05M Na-Succinate, 0.1M Phosphate buffer (pH 7.1), cell suspension and 50 $\mu\text{g/ml}$ of tetracycline.

Nitrite accumulation was measured after reaction at 30°C for 30min.

P-24 : *Pseudomonas fluorescens* P-24

P-40 : *Pseudomonas fluorescens* P-40

E-2 : *Enterobacter aerogenes* E-2

E-4 : *Enterobacter cloacae* E-4

E-8 : *Klebsiella pneumoniae* E-8

3. 硝酸還元酵素活性におよぼすpHの影響

醗酵漬物は乳酸醗酵の進行にともなってpHが低下していくが、一般的に醗酵開始時はpH6.5前後で醗酵が進み、最も好ましい味を呈するようになるのはpH4.0付近であることが多い。亜硝酸生成細菌が活動する時期はpH5.0付近に低下するまでで、それ以降は死滅するのが通常の経過である。そこで、その間における硝酸還元酵素活性に及ぼすpHの影響について検討を加え、Fig. 29の結果を得た。*Ps. fluorescens* P-24、P-40株の場合は実験の範囲内ではpHが上昇するに従い、酵素活性も高まる傾向がみられ、pH7.5ではpH4.5の場合の酵素活性のほぼ2倍に達した。一方、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4および*K. pneumoniae* E-8株においては*Ps. fluorescens* P-24、P-40株の場合ほどpHの影響は大きくなかったが、pHが上昇するに従い、酵素活性が高まる傾向は同様であった。

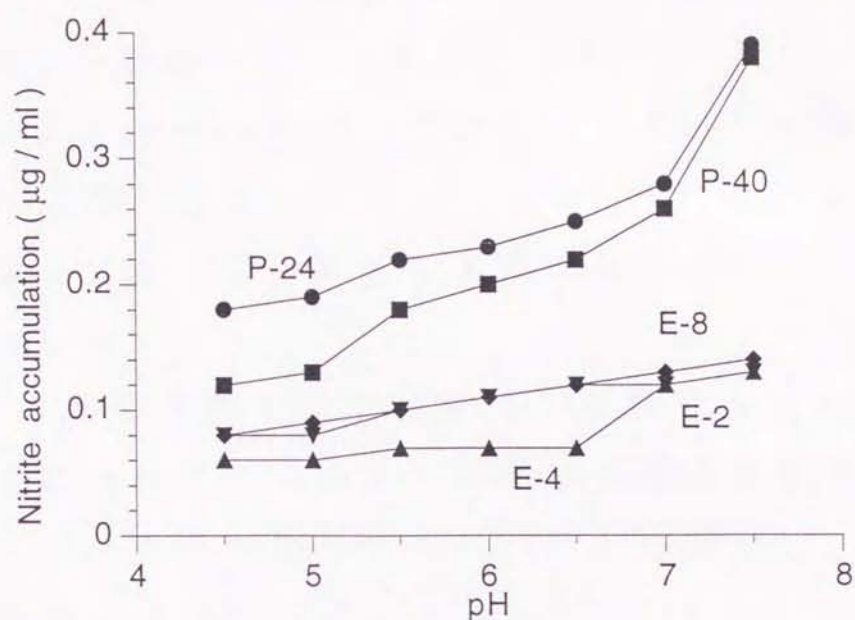


Fig. 29 Effects of pH on the nitrate reductase activity of bacteria isolated from fermented pickles

Reaction mixture contained 0.05M NaNO_3 , 0.05M Na-Succinate buffer and cell suspension.

Nitrite accumulation was measured after reaction at 30°C for 30min.

P-24 : *Pseudomonas fluorescens* P-24

P-40 : *Pseudomonas fluorescens* P-40

E-2 : *Enterobacter aerogenes* E-2

E-4 : *Enterobacter cloacae* E-4

E-8 : *Klebsiella pneumoniae* E-8

4. 硝酸還元酵素活性に及ぼす有機酸及び糖の影響

細菌の硝酸還元に関しては特に大腸菌を用いた研究が多く、その電子伝達系はギ酸から硝酸還元酵素への経路が主経路と報告されているものが多い⁷²⁻⁷⁴⁾。また、*B. stearothermophilus*ではリンゴ酸から硝酸還元酵素系への経路が主経路とされている⁷⁵⁾。このように、細菌の違いによって、電子伝達系に差異があることが一般的に知られている。

カブの醗酵漬物を製造する際の有機酸の変化をみると醗酵初期にはカブに由来するリンゴ酸が漬け液に多くみられるが、醗酵が進行するにしたがい減少し、乳酸や酢酸が増加する傾向が認められる⁷⁶⁾。また、これらの有機酸以外にも少量ではあるが、ギ酸、酪酸、コハク酸が存在し、それらの量の変動もみられる。そこで、これらの有機酸が供試菌の硝酸還元酵素活性の賦活化に及ぼす影響について調べ、その結果をTable 25に示した。

Ps. fluorescens P-24、P-40株の場合は特に乳酸、リンゴ酸に賦活作用がみられた。一方、*Enterobacter aerogenes* E-4株はギ酸、乳酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸が、*Enterobacter cloacae* E-4株では酢酸、リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、乳酸が、*K. pneumoniae* E-8株ではリンゴ酸、フマル酸、コハク酸が比較的強い賦活作用を示した。したがって、カブなどの原料野菜に含まれているリンゴ酸は亜硝酸の生

成に一部寄与しているものと考えられる。また、乳酸も亜硝酸の生成を促進することを考慮すると、醗酵初期に生産される少量の乳酸は亜硝酸の生成を促すが、生産量が増加するにつれ、逆に亜硝酸生成細菌の増殖を抑制し、死滅を促進するものと考えられる。

Table 25 Effects of various organic acids on the nitrate reductase activity

Organic acids	NO ₂ -N μ g/ml/day				
	P-24	P-40	E-2	E-4	E-8
Formic acid	0.09	0.10	2.88	0	0
Propionic acid	0.14	0.32	0.04	0.04	0.11
Acetic acid	0.11	0.20	0	2.89	1.66
Fumaric acid	0.53	0.19	2.40	2.73	2.85
Succinic acid	0.36	0.24	2.26	2.73	3.00
Malic acid	0.78	1.37	2.53	2.79	2.41
Citric acid	0.05	0.03	0.01	0	0
Tartaric acid	0.04	0.01	0	0	0
Lactic acid	1.80	0.75	2.62	2.67	1.11

Reaction mixture contained 0.1% of acid -Na salt, 0.05M NaNO₃, 0.1M phosphate buffer (pH 7.1), cell suspension and 50 μ g/ml of tetracycline. Nitrite accumulation was measured after reaction at 20 °C for 24 hrs.

P-24 : *Ps. fluorescens* P-24

P-40 : *Ps. fluorescens* P-40

E- 2 : *Ent. aerogenes* E-2

E- 4 : *Ent. cloacae* E-4

E- 8 : *K. pneumoniae* E-8

つぎに糖の影響について検討を加えた結果をTable 26に示した。*Ps. fluorescens* P-24、P-40株の場合は果糖がやや亜硝酸の生成を促進する傾向が認められたが、他の糖と比較してそれほど差はみられなかった。一方、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Enterobacter cloacae* E-4、*K. pneumoniae* E-8株の場合はブドウ糖に顕著な賦活作用がみられた。野菜にはブドウ糖や果糖が多いことから、亜硝酸の生成に関しては糖の影響も考えられ、特に、*Enterobacter*属菌、*Klebsiella*属菌の硝酸還元酵素への寄与が高いものと考えられた。

Table 26 Effects of various sugars on the nitrate reductase activity

Sugars	NO ₂ -N μ g/ml/day				
	P-24 *	P-40*	E-2**	E-4**	E-8**
Glucose	0.25	0.56	13.11	32.57	31.51
Fructose	0.74	0.93	4.02	7.91	19.01
Sucrose	0.20	0.69	0.44	3.54	0.80
Xylose	0.18	0.50	0.07	0.22	0.59
Maltose	0.22	0.40	1.44	1.69	0.68

* : Measured after 6hrs

** : Measured after 4 hr.

Reaction mixture contained 0.1% of acid -Na salt, 0.05M NaNO₃, 0.1M phosphate buffer (pH 7.1), cell suspension and 50 μ g/ml of tetracycline. Nitrite accumulation was measured after reaction at 20 °C for 24 hrs.

P-24 : *Ps. fluorescens* P-24P-40 : *Ps. fluorescens* P-40E- 2 : *Ent. aerogenes* E-2E- 4 : *Ent. cloacae* E-4E- 8 : *K. pneumoniae* E-8

第 3 節 要 約

醗酵漬物から分離した亜硝酸生成細菌を対象に、亜硝酸の蓄積及び硝酸還元酵素活性に及ぼす製造環境要因の影響について調べた。

(1) *Pseudomonas*属菌は20～30℃で最も増殖が活発で、亜硝酸の蓄積も10～30℃で多かった。*Enterobacter*属菌、*Klebsiella*属菌は30～40℃で最も増殖

が活発で、亜硝酸の蓄積も30～40℃で多かった。

(2) *Pseudomonas*属菌は食塩の存在しない条件下で増殖、亜硝酸の蓄積とも多く、食塩濃度が4%以上あると増殖は阻害され、亜硝酸もほとんど蓄積されなかった。*Enterobacter*属菌、*Klebsiella*属菌は食塩濃度6%でも菌の増殖と亜硝酸の蓄積がみられ、1～2%の食塩存在下で最も多かった。

(3) 硝酸還元酵素活性は*Pseudomonas*属菌では食塩濃度が高まるにつれ急激に低下したが、*Enterobacter*属菌や*Klebsiella*属菌ではそれほど大きな低下はみられなかった。

(4) 硝酸還元酵素活性に対し、有機酸のなかではリンゴ酸や乳酸が比較的強い賦活作用を示した。したがって、原料野菜に含まれているリンゴ酸は亜硝酸の生成に一部寄与しているものと考えられた。

(5) 硝酸還元酵素活性に対する糖の影響をみたところ、*Pseudomonas*属菌では、果糖が活性を促進する傾向が認められ、*Enterobacter*属菌、*Klebsiella*属菌ではブドウ糖や果糖に顕著な賦活作用が認められた。

第8章

温和加熱を利用した漬物の醗酵制御

前章までにおいて、過度の亜硝酸の生成によって、醗酵漬物が正常に醗酵しない例を見いだし、その理由は亜硝酸生成細菌の異常な増殖にもとづくことを明らかにするとともに、亜硝酸と漬物の醗酵との関係について検討を加えた。その結果、醗酵漬物の製造において亜硝酸の異常な生成を抑制し、安定的な醗酵を進行させるには亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌を醗酵初期の段階において効果的に抑制することが重要であることが明らかとなった。そこで、以後の研究では有効な微生物制御技術について検討を行なうこととした。

長野県木曾御岳山麓で作られている「すんき漬」は食塩を全く使わない無塩の醗酵漬物として知られており、原料野菜の王滝蕪を湯に一定時間浸漬した後漬けこみ、乳酸醗酵を行なわせるのが特徴である⁷⁷⁾。同様に、中国北京地方で作られている無塩漬物の酸菜も湯に浸漬した後、醗酵させて作られている⁷⁸⁾。湯に浸漬することは原料野菜に付着している昆虫類の除去や野菜をある程度柔らかくし、漬けこみやすくするためと言われている。しかしながら、そのような効果の他に、乳酸醗酵を正常に進行させるために亜硝酸生成細菌などの有害菌を減少させ、乳酸菌が活動しやすい環境を作り出している

とも考えられる。

Hurstらは*Staphylococcus aureus*が52℃の温和な加熱処理により食塩耐性が低下することを報告し⁷⁹⁾、土戸らは*Candida utilis*の加熱損傷に対する薬剤併用効果について検討を加え、温和加熱処理により細胞膜の損傷やRNAの分解が生じ、ソルビン酸に対する感受性が増大することを報告している^{80,81)}。

このような温和加熱処理による細菌への影響はすんき漬の製造においても有りうることから、それを醗酵に利用していたことが推測される。そこで、原料野菜の温和加熱処理が野菜付着細菌及び醗酵に及ぼす影響について検討を加えるとともに温和加熱処理が醗酵漬物における微生物制御に利用できるかどうかについて検討を加えた。

第1節 方 法

1. 供試菌株

供試菌株は、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株 (*Pseudomonas fluorescens* P-24、*Flavobacterium* sp. F-4、*Enterobacter aerogenes* E-2、*Klebsiella pneumoniae* E-8、*Micrococcus varians* M-4、*Leuconostoc mesenteroides* L-11、*Enterococcus faeca*

lis ML-8、*Enterococcus faecium* ML-12、*Pediococcus pentosaceus* ML-4、*Lactobacillus plantarum* L-4) で醗酵漬物を製造する際に出現する細菌のうち主要なものを用いた。前培養は培地として次の組成のもの（トリプチケースペプトン5g、酵母エキス2.5g、ブドウ糖1g/1l、pH6.4）を用い行なった

2. 生菌数の測定

一般的に生菌数を測定する際は標準寒天培地（栄研化学）を用い、常法により混釈培養法で行なった。選択計数を行なう必要がある際は、グラム陽性細菌に関しては、PEA培地（BBL）、グラム陰性細菌はCVT寒天培地（日水）を用い、塗抹法により30℃、48時間培養後、計数した。なお、加熱損傷菌の回復増殖に対する食塩の影響をみる際は、目的濃度の食塩を加えた標準寒天培地を用いて計数し、対照のものと比較した。

3. 菌体外漏洩物質

温和加熱処理（45～55℃）による菌体細胞内成分の漏洩物質の測定は次の方法により行なった。洗浄菌体の濃度が約0.1mg/mlとなるようリン酸緩衝液（pH

6.8）に懸濁させた試料を温和加熱処理し、一定時間ごとに遠心管に採取し、3000rpm、10分間遠心分離後、

その上澄液を無菌濾過し、その濾液について260 nm 吸収物質、オルシノール法によるRNA様物質⁸²⁾、フェノール硫酸法⁸³⁾による全糖の測定を行なった。

4. 亜硝酸の定量

調製した醗酵漬物において細菌の増殖にともなって生成される亜硝酸の定量は第5章に準拠し、スルファニルアミドでジアゾ化し、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。

第2節 結果及び考察

1. 野菜付着菌の死滅に及ぼす温和加熱の影響

カブを細刻したものを試料とし、一定時間、温和加熱処理(45、50、55℃)を行なった場合の残存菌数の変化を調べたものがFig. 30である。グラム陽性細菌は加熱30分経過後において45℃ではほとんど死滅せず、50℃では約1/10に、55℃では1/10000に生菌数が減少した。しかし、10分間の加熱では50℃ではほとんど変化がなく、55℃においても1オーダー低下したに過ぎなかった。一方、グラム陰性細菌は45℃の加熱でも徐々

に死滅し、30分経過後は約1/10に減少した。50℃ではさらに死滅は促進され、20分後で約1/100、30分後では約1/1000まで減少した。また、55℃では10分間の加熱でほとんどのものが死滅した。したがって、漬物原料野菜を温湯に浸漬することは亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌の減少をはかるとともに乳酸菌が増殖しやすい状態にしているものと推察された。

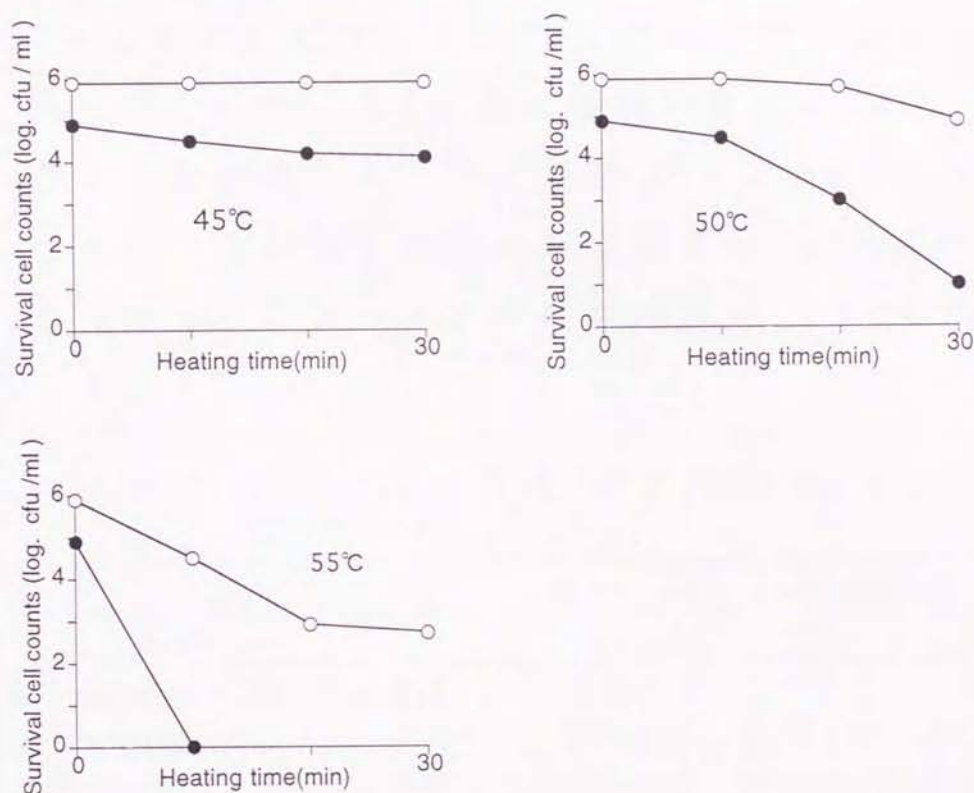


Fig. 30 Effects of various heating temperatures on the viability of bacteria on turnips

The turnips were heated in sterile water and each bacteria were enumerated on the PEA and CVT medium.

○ : Gram positives ● : Gram negatives

2. 漬物由来細菌の死滅に及ぼす温和加熱の影響

野菜付着細菌のうち、グラム陰性細菌がグラム陽性細菌よりも温和加熱処理によって死滅しやすいことが明らかとなったので、つぎに漬物由来細菌の死滅に対する温和加熱処理の影響について調べた結果をTable 27に示した。45℃、15分間の加熱では*Ps. fluorescens*が1/100に減少したが、それ以外の細菌はほとんど変わらなかった。50℃、15分間の加熱の場合は*Ps. fluorescens*の死滅が著しく、残存菌数は30/ml以下となった。また、それ以外のグラム陰性細菌も1/100から1/1000に減少したが、グラム陽性細菌は1/10に減少したにとどまった。

Table 27 Thermal death of various bacteria after moderate heat treatment

Strain		Viable cell counts (cfu/ml)		
		Unheated	45℃	50℃
<i>Ps. fluorescens</i>	P-24	4.8×10^5	2.7×10^3	<30
<i>Flavobacterium</i> sp.	F-4	6.3×10^5	4.7×10^5	2.1×10^2
<i>Ent. aerogenes</i>	E-2	6.2×10^5	6.0×10^5	5.1×10^3
<i>Kl. pneumoniae</i>	E-8	5.4×10^5	5.4×10^5	2.0×10^2
<i>Mic. varians</i>	M-4	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^4
<i>Leuc. mesenteroides</i>	L-11	8.1×10^5	8.0×10^5	5.4×10^3
<i>Str. faecalis</i>	ML-8	5.8×10^5	5.6×10^5	8.4×10^4
<i>Str. faecium</i>	ML-12	5.3×10^5	5.3×10^5	7.2×10^4
<i>Ped. pentosaceus</i>	ML-4	5.0×10^5	5.1×10^5	6.5×10^4
<i>Lact. plantarum</i>	L-4	5.1×10^5	5.2×10^5	4.8×10^4

Cells grown in nutrient broth were washed, resuspended and heated in phosphate buffer (pH6.8) for 15 min.

3. 温和加熱処理による細胞成分の漏洩

50℃の温和加熱によって細菌細胞の死滅が起こり、それは特にグラム陰性細菌で顕著であったが、細胞の死滅と並行して細胞内成分の漏洩が起こっていることが予想される。そこで、45、50℃で30分間加熱処理した菌体から漏洩してくる物質量を測定しその結果をTable 28に示した。

Table 28 Leakage of 260 nm absorbing materials, orcinol reactive materials and carbohydrate from heated cells

Strain		260nm absorbing materials		Orcinol positive materials		Carbohydrate	
		45℃	50℃	45℃	50℃	45℃	50℃
<i>Ps. fluorescens</i>	P-24	0.56	0.58	15.8	15.3	14.0	12.3
<i>Flavobacterium</i> sp.	F-4	1.09	1.17	23.0	23.5	25.4	30.0
<i>Ent. aerogenes</i>	E-2	0.27	0.42	2.8	5.9	6.5	14.6
<i>Kl. pneumoniae</i>	E-8	0.41	0.41	3.1	3.4	3.2	6.2
<i>Mic. varians</i>	M-4	0.04	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Leuc. mesenteroides</i>	L-11	0.02	0.02	0.0	0.0	3.4	3.4
<i>Str. faecalis</i>	ML-8	0.03	0.03	0.0	0.0	3.0	2.2
<i>Str. faecium</i>	ML-12	0.04	0.04	0.0	0.0	3.5	3.4
<i>Ped. pentosaceus</i>	ML-4	0.05	0.07	0.0	0.0	5.0	6.2
<i>Lact. plantarum</i>	L-4	0.06	0.08	0.0	0.0	5.0	6.2

Cells grown in nutrient broth were washed, resuspended and heated in phosphate buffer (pH6.8) for 30 min.

260nm absorbing materials: OD at 260 nm

Orcinol reaction positive materials: as RNA $\mu\text{g/ml}$

Carbohydrate: as glucose $\mu\text{g/ml}$

グラム陰性細菌の場合は45℃の加熱処理で細胞内成分の漏洩が認められることから、45℃という比較的温和な加熱処理によっても細胞膜の損傷やRNAの分解が起こっていることが考えられる。なお、50℃の加熱処理によっても漏洩量はあまり増加がみられず、45℃の場合とあまり変わりがなかった。*Flavobacterium* sp.、*Enterobacter aerogenes*、*Kl.pneumoniae*は45℃の加熱処理では死滅はあまり認められなかったが、細胞内成分の漏洩が起きていることから、死滅にいたるほどの損傷は与えていないまでも、温和な加熱処理においても細胞膜の損傷及びRNAの分解が生じていることが推定される。

一方、乳酸菌を含むグラム陽性細菌は260nm吸収物質、RNA様物質ともにほとんど漏洩が認められず45、50℃で短時間の加熱処理では細胞膜に対してあまり損傷を与えていないものと考えられる。

つぎに、細胞内成分の漏洩が加熱時間の経過とともにどのように変化するかをみるために、50℃の温和加熱処理を行なった場合について検討を加え、その結果をグラム陰性細菌についてはFig. 31に、乳酸菌についてはFig. 32に示した。グラム陰性細菌の場合は加熱後、急速に細胞内成分の漏洩が始まり、時間が経過するにつれ漏洩量はさらに増大した。乳酸菌の場合は加熱時間を長くすると漏洩が認められるようになったが、その量はわずかであった。したがって、細胞内成分の漏洩は比較的

短時間のうちに生じることから原料野菜を湯に浸漬する場合においても付着細菌に対して加熱損傷を与えていることが推察される。

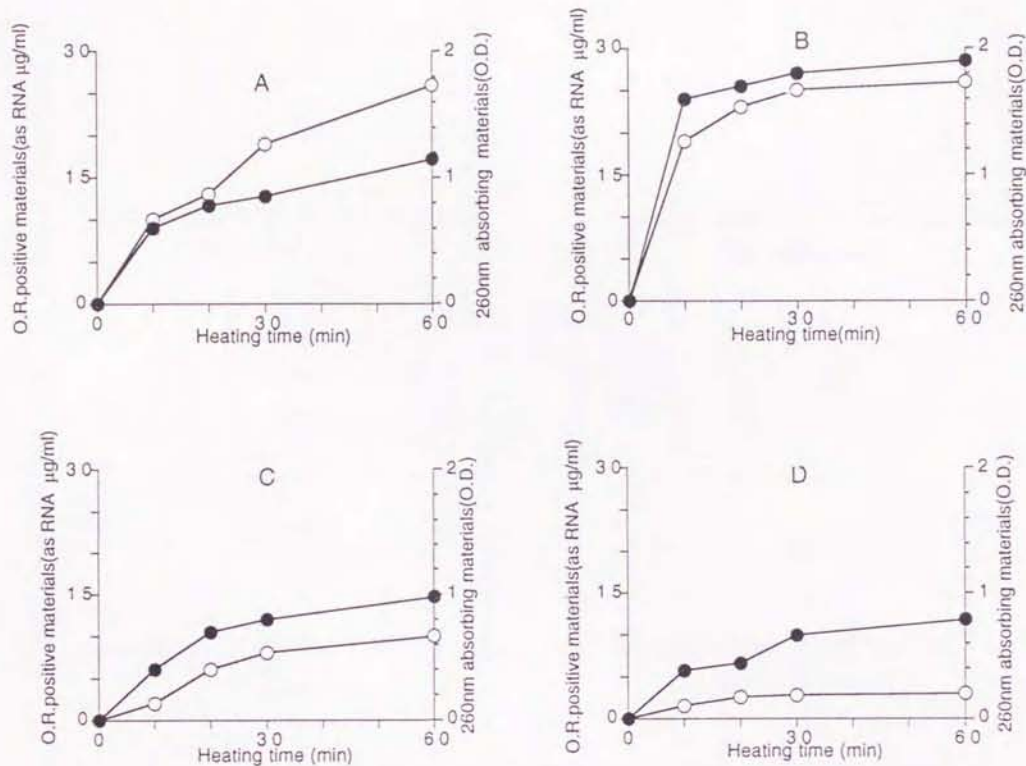


Fig. 31 Leakage of 260nm absorbing materials and orcinol reactive materials from heated suspension cells of various Gram negative bacteria in phosphate buffer (pH6.8) at 50°C

● : 260nm absorbing materials

○ : Orcinol reaction positive materials (as RNA)

A : *Pseudomonas fluorescens* P-24

B : *Flavobacterium* sp. F-4

C : *Enterobacter aerogenes* E-2

D : *Klebsiella pneumoniae* E-8

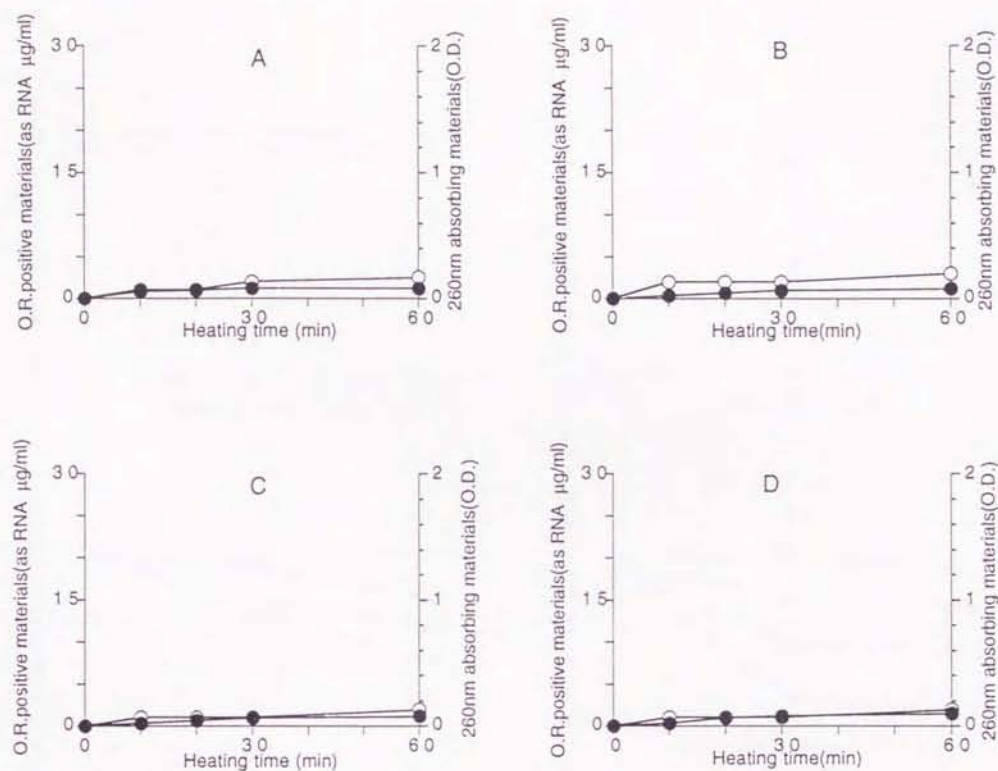


Fig. 32 Leakage of 260nm absorbing materials and orcinol reactive materials from heated suspension cells of various Gram - positive bacteria in phosphate buffer (pH6.8) at 50°C

● : 260nm absorbing materials

○ : Orcinol reaction positive materials (as RNA)

A : *Leuconostoc mesenteroides* L-11

B : *Enterococcus faecalis* ML-8

C : *Pediococcus pentosaceus* ML-4

D : *Lactobacillus plantarum* L-4

4. 温和加熱殺菌による食塩耐性の低下

漬物由来細菌の食塩耐性が温和加熱によってどの程度影響を受けるのかを検討したものがFig. 33である。

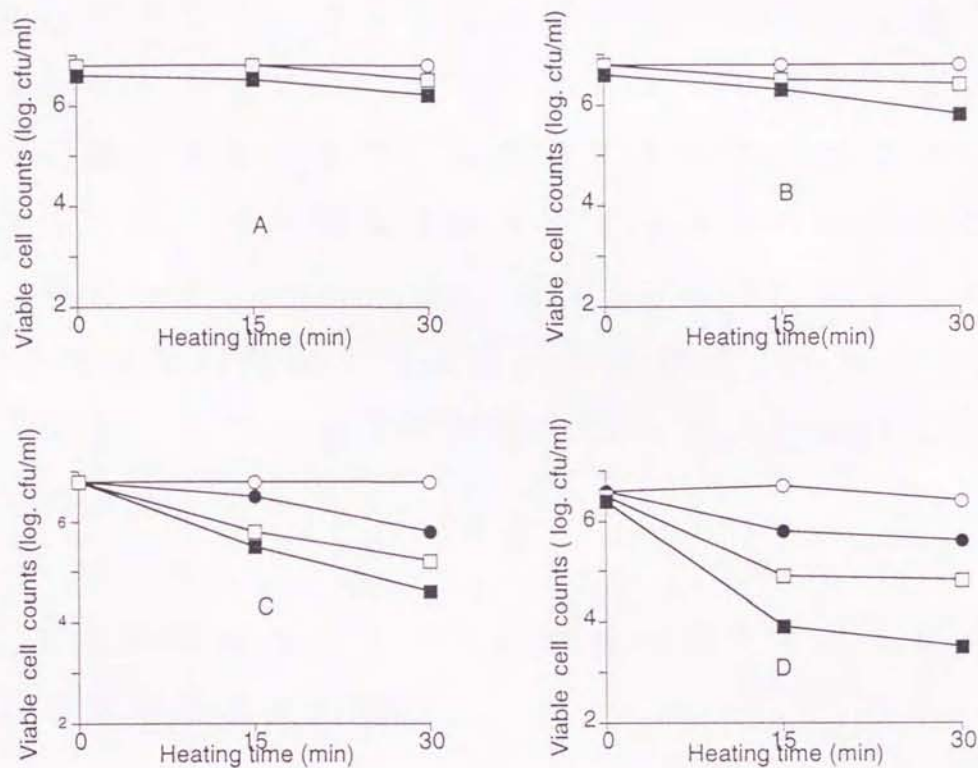


Fig. 33 Loss of NaCl tolerance of cells of various strains heated at 45°C

Cells were grown in nutrient broth, washed, resuspended and heated in sterile water. Samples were removed periodically and plated on PCA media containing 0, 2, 3, 4% of NaCl.

○ : NaCl free ● : 2% NaCl
□ : 3% NaCl ■ : 4% NaCl

A : *Micrococcus luteus* M-3
B : *Lactobacillus plantarum* L-4
C : *Enterobacter aerogenes* E-2
D : *Klebsiella pneumoniae* E-8

Mic. luteus 及び *Lact. plantarum* は 45°C で 30 分間処理しても 4% 食塩培地においてコロニー形成能はわずかな減少にとどまっておリ、温和加熱処理によって食塩耐性の低下はあまり認められなかった。しかし、*Ent. aerogenes* 及び *Kl. pneumoniae* の場合は 30 分間の加熱処理後においては食塩が無添加の培地では損傷菌の回復がみられ、コロニー形成能にあまり変化がなかったが、食塩が添加されている培地においてはコロニー形成能は低下し、それは食塩濃度が高まるにつれ顕著であった。特に、*Kl. pneumoniae* は 4% 食塩加培地において 30 分間の加熱処理でコロニーの形成は $1/100$ に低下していることから温和加熱処理によって食塩耐性は低下するものと考えられる。

5. 温和加熱処理したカブの醗酵初期における微生物及び亜硝酸濃度の変化

温和加熱処理 (50°C 、20 分間) が実際の漬物の醗酵に及ぼす影響を知る目的から、試験を行ない、その醗酵初期における細菌数及び亜硝酸濃度の変化について調べたものが Fig. 34 である。対照はグラム陰性細菌が多く 1 日目で $10^8/\text{ml}$ 近くまで増加し、亜硝酸濃度も $48\mu\text{g}/\text{ml}$ に達した。温和加熱処理を行なった場合は、対照のものと比較し、グラム陰性細菌数は $10^5/\text{ml}$ から $10^2/\text{ml}$ 、グラム陽性細菌数は $10^4/\text{ml}$ から $10^3/\text{ml}$ に低下

し、温和加熱処理がグラム陰性細菌を減少させるのに効果的であることを示した。つぎに生菌数の変化をみると初発菌数の低下にともない生菌数及び亜硝酸の増加は遅延し、生菌数が $10^8 / \text{ml}$ 近くまで増加したのは3日目となり、亜硝酸の生成量は $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ にとどまった。したがって、温和加熱処理は原料野菜に付着している細菌のうち、特にグラム陰性細菌の減少に対して効果があり、同時にその後の醗酵において亜硝酸の生成量が少なくなることが明らかとなった。

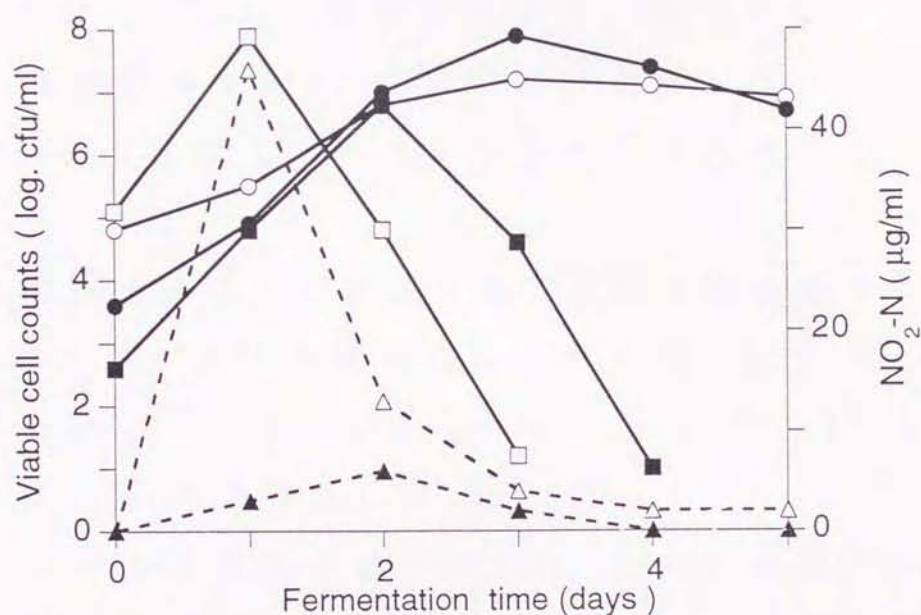


Fig. 34 Changes of bacteria and nitrite of pickling turnips treated with mild heating (50°C) during fermentation at 20°C

- : Gram - positive bacteria, control
- : Gram - positive bacteria, heated
- : Gram - negative bacteria, control
- : Gram - negative bacteria, heated
- △ : Nitrite, control
- ▲ : Nitrite, heated

第3節 要 約

醃酵漬物の製造の際に原料野菜を湯に一定時間浸漬する例が、「すんき漬」や中国の「酸菜」にみられるが、それは亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌を抑制することにより、乳酸菌の生育を進行させているものと推測した。したがって、このことを解明することが醃酵漬物の製造を制御する上で有効と考え、その意義を知る目的から醃酵漬物から分離した細菌を対象に、50℃近辺の温和加熱処理が細菌の死滅、細胞内成分の漏洩及び漬物の醃酵における亜硝酸の蓄積に及ぼす影響について調べ、新たに、つぎの結果を得ることができた。

(1) 原料野菜を50℃で温和加熱処理したところグラム陽性細菌と比較してグラム陰性細菌は死滅しやすい傾向が認められた。

(2) 醃酵漬物由来細菌を対象に温和加熱処理を行なったところ、グラム陰性細菌のなかでも *Pseudomonas fluorescens* が特に感受性が高く、45℃、15分の加熱処理で1/100に減少した。

(3) グラム陰性細菌は45℃の温和加熱処理で細胞内成分の漏洩が認められ、細胞膜の損傷やRNAの分解が起こっていることが推定された。しかし、グラム陽性細菌からの漏洩はわずかであった。

(4) 温和加熱処理によってグラム陰性細菌の食塩耐性は低下した。

(5) 温和加熱処理は原料野菜に付着しているグラム陰性細菌の減少に対して、効果があり、その後の醗酵において亜硝酸の蓄積量は少なかった。

(6) 以上の結果から、醗酵漬物を製造する際は、50℃前後で短時間、温和加熱処理する方法が亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌の生育を抑制し、乳酸菌が増殖しやすい環境を作る上で有効な方法であることを明らかにした。