

第9章

アリルイソチオシネートによる
漬物の醗酵制御

漬物の異常醗酵の原因の一つである亜硝酸生成細菌を抑制し、安定的な醗酵を行なうための一つの方法として、第8章では温和加熱を利用した醗酵制御法について検討を加え、有効な方法であることを明らかにした。第9章では同様にグラム陰性細菌の生育を抑制し、醗酵を制御する方法としてカラシの主成分であるアリルイソチオシアネート(以後、AITCと呼称)を利用した方法について検討をくわえた。

近年、植物由来の蒸留成分に抗菌性のあることが多く報告されるようになってきているが、カラシの主要な刺激成分であるAITCはカブ、キャベツ、ワサビなどを含む *Brassica* 属の野菜に含まれているグルコシノレートが酵素のミロシナーゼにより分解を受け、生じる揮発性成分である⁸⁴⁾。Beuchatは1%のカラシを添加した培地では *Vibrio parahaemolyticus* の増殖が抑制されたことを報告し⁸⁵⁾、Goi et alはAITCを寒天培地に添加した場合の抗菌力はわずかであったが、ガス状で微生物に接触させた場合は顕著な抗菌力を示したことを報告している⁸⁶⁾。また、Kanemaru et alは *Staphylococcus aureus* や *Escherichia coli* の生育に対す

るカラシの効果は静菌的であったが、*Pseudomonas aeruginosa* に対しては殺菌的であったことを報告している⁸⁷⁾。さらに、太田らは広島菜漬においてAITCは乳酸菌に対しては制菌効果を示したに過ぎなかったが、グラム陰性細菌に対しては5mg/100mlで殺菌効果を示したことを報告している⁸⁸⁾。

このように、AITCの抗菌力は培地に添加する形態より気相で微生物に接触させた方がより強くあらわれ、その抗菌スペクトラムはグラム陰性細菌や酵母に対しては強い抗菌力を示すが、乳酸菌やグラム陽性細菌に対しては弱い傾向のあることを示している。

また、Itoh et alは漬物に利用されている野菜の多くにAITCが含まれていることを報告し⁸⁹⁾、Karki et alは塩漬中のグラム陰性細菌と大腸菌は、食塩、乳酸醗酵と*Brassica*属野菜に含まれているAITCの共同作用で生育が阻害されたものと推察している⁹⁰⁾。以上のことからAITCを適切に使用すれば漬物の醗酵制御に利用できることを示唆している。そこで、第9章ではガス状のAITCを漬物の醗酵制御に利用した場合の効果について検討を加えた。

第1節 方法

1. 材料

本試験で使用したAITCは黒カラシの種子より水蒸気蒸留によって得られたものでミドリ十字株式会社から譲与されたものを使用した。また、醗酵漬物を製造する際は原料用野菜としてカブを用いた。

2. 使用菌株

本試験においては、菌株として以下のものを使用した。が、*Leuconostoc mesenteroides* L-11、*Enterococcus faecalis* ML-8、*Pediococcus pentosaceus* ML-4、*Pediococcus acidilactici* ML-5、*Lactobacillus plantarum* L-4、*Bacillus subtilis* B-7、*Klebsiella pneumoniae* E-8、*Flavobacterium luteus* M-3、*Pseudomonas fluorescens* P-24、*Enterobacter aerogenes* E-6、*Enterobacter cloacae* TFC-1018、*Saccharomyces cerevisiae* TFC-3002 は原料野菜あるいは醗酵漬物から分離し、当研究室において同定したものであり、

Lactobacillus brevis IFO3345と*Pichia membranaefaciens* IFO0189はIFOより譲与されたものを使用した。

3. 醗酵漬物の調製

市販のカブを購入し洗浄した後、Fig. 35に示すようにガラス製のデシケーターにカブを約10個入れ、蓋で密閉した後、ガス濃度が $4.8 \mu\text{g/ml}$ となるよう調整したガス状のAITCで7.5、15、30分間還流装置を使用してカブを処理した。つぎに、カブ重量と同量の3.0%食塩水を加えた後、 15°C で醗酵をおこなった。醗酵中は適当な間隔で、検体を採取し、pH、亜硝酸濃度、微生物の測定に供した。

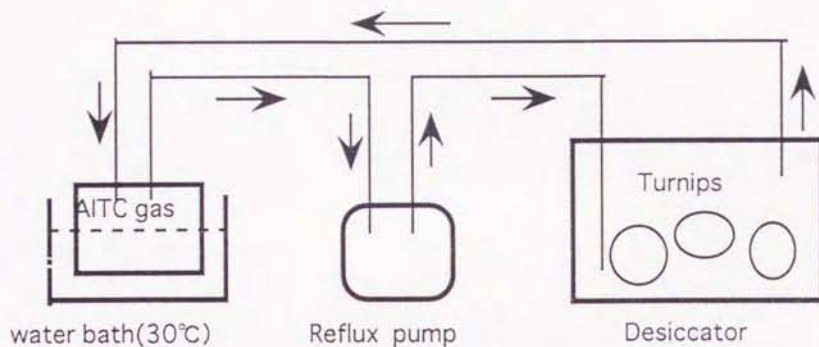


Fig. 35 Apparatus for AITC refluxing

4. ガス状AITCの抗菌活性の測定

一般細菌を対象とした場合は標準寒天培地（栄研）、乳酸菌の場合はMRS寒天培地（Difco）、酵母を対象とした場合はYM寒天培地（Difco）をあらかじめ径90mmの滅菌シャーレに調製しておき、それぞれ培地表面に被験株を塗抹した。つぎに0～2.0mgのAITCを30×30mmの濾紙に含浸させたものをシャーレのフタの内側に貼付し、それに被験株を塗抹したシャーレを倒置した。そして、ビニールテープでガス状のAITCが漏れないように密閉した後30℃で5日間培養し、その間における被験菌株の生育状況を観察し、その有無を+、-で表現した。

5. 微生物叢の計数

漬物の醗酵経過における微生物叢の菌数変化を調べる際は以下のように行なった。試料調製をする際は、試料の漬物カブを時間経過毎に1個採取し、滅菌包丁で無菌的に細刻した後、均一にし、その中から10gをストマッカー袋に入れ、滅菌リン酸緩衝液（pH6.8）を90mlを注加し、ストマッカーにより1分間微生物の抽出を行なった。その後、同様のリン酸緩衝液を用いて、10倍段階

希釈を行ない、測定用の試料を調製した。つぎに、一般生菌数はプレートカウントアガー (Difco) を用い、35℃、48時間培養後、グラム陽性細菌は0.25% 2-フェニルエチルアルコール加プレートカウントアガーを用い、35℃、48時間培養後、出現したコロニーを計数した。グラム陰性細菌はCVT寒天培地 (日水製薬) を用い、30℃、72時間培養後、赤変コロニーを計数した。大腸菌群数はデソキシコレート培地 (栄研化学) を用い、重層させた後、35℃、24~48時間培養後、典型的な赤色コロニーを計数することによって得た。また、乳酸菌は炭酸カルシウムを含むGYP培地 (第4章参照) を用い、35℃、72時間培養後、コロニーの周囲にクリアゾーンを有するコロニーを計数し、乳酸菌数とした。酵母及びカビは0.01%となるようクロラムフェニコールを添加したYM寒天培地 (Difco) を用い、30℃、72時間培養後計数した。

6. 分離菌株の同定

各培地より分離した菌株は、細胞の形状、グラム染色性、糖の発酵性、生育温度、OF試験、カタラーゼ、オキシダーゼ反応などの性状をもとに、Bergey's Manual^(48, 49)を参考にし、同定を行なった。

7. AITC 及び 亜硝酸の分析

還流させたガス状の AITC 濃度の測定は以下の方法により行なった。すなわち、ガスクロマトグラフとして島津 GC-14A を用い、検出器は FID を使用した。カラムは 3mm×3m のガラスカラムを用い、support は shimadex W (島津)、液相は SBS-200 (島津) のものを使用した。分析条件はインジェクション 温度 200℃、カラム 温度 120℃、キャリアーガスとしてヘリウムを、用い、流量 50 ml/min で行なった。試料の AITC ガスは還流装置とデシケーターの間においてセプタムを介してガスタイトシリンジで 500 μ l 採取し、ただちに分析に供した。亜硝酸の分析は第 5 章に記述した方法に準じて行なった。

第 2 節 結果及び考察

1. ガス状 AITC の抗菌スペクトラム

ガス状の AITC の抗菌スペクトラムを調べた結果を Table 29 に示した。漬物由来の亜硝酸生成細菌の一つである *Ps. fluorescens* や *Enterobacter aerogenes* を含むグラム陰性細菌は 0.5 mg / petri dish で増殖が抑制され、酵母も同濃度で抑制されたが、*Leuc. mesenteroides* や *Lact. plantarum* などの乳酸菌はいずれの菌

株も 1.5 mg / petri dish では抑制されず、2.0 mg / petri dish で増殖が抑制された。これは、太田らの広島菜漬に AITC を利用した場合の結果⁸⁸⁾と同様の傾向を示した。

Table 29 Antimicrobial activity of allyl isothiocyanate by vapor on microorganisms derived from pickles

Strains		AITC (mg/petri dish)							
		0	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
<i>Leuc. mesenteroides</i>	L-11	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ML-8	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ped. pentosaceus</i>	ML-4	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Ped. acidilactici</i>	ML-5	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lact. plantarum</i>	L-4	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lact. brevis</i>	IFO3345	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. subtilis</i>	B-7	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Kl. pneumoniae</i>	E-8	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Fl. luteus</i>	M-3	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Ps. fluorescens</i>	P-24	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	E-1	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	E-6	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	TFC1018	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>P. membranaefaciens</i>	IFO0189	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	TFC3002	+	+	+	+	-	-	-	-

2. ガス状AITCを曝露したカブの微生物叢の変化

原料野菜のカブを密閉ガラス容器に入れた後、ガス状のAITC ($4.8 \mu\text{g/ml air}$)を導入し、30分間曝露させた場合のカブに付着している微生物の生残について検討した結果をTable 30に示した。AITCで処理する前は*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Micrococcus*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas*、*Enterobacter*、*Klebsiella*属の細菌、酵母、カビなど、多くの種類の微生物がカブに付着しており、特に、グラム陰性細菌の*Pseudomonas*属細菌や*Flavobacterium*属細菌が多く分離された。AITCを30分間処理した後は、グラム陰性細菌の多くが死滅したが、乳酸菌を含むグラム陽性細菌は生残する傾向のあることが認められた。

Fig. 36は同様にカブにガス状のAITCを曝露させた場合の生残菌数の変化を示したものである。グラム陰性細菌数は処理前は約 $8 \times 10^5/\text{g}$ であったが、7.5、15、30分間処理後はそれぞれ、 5×10^4 、 5×10^3 、 $10^2/\text{g}$ まで減少した。真菌数及び大腸菌群数はほぼ同様の減少傾向を示し、約 $5 \times 10^3/\text{g}$ から7.5、15分間処理後にはそれぞれ 10^3 、 $5 \times 10^2/\text{g}$ まで減少し、30分間処理した場合は10以下に減少した。一方、グラム陽性細菌数は処理前は約 $7 \times 10^7/\text{g}$ で、15、30分間処理後においても 10^5 、 $10^4/\text{g}$ が生残しており、乳酸菌を含むグラム

陽性細菌はAITCに対して抵抗性を有していることを確認することができた。

Table 30 Changes of microflora on turnips treated with allyl isothiocyanate by vapor contact

before treatment		after treatment(30min.)	
bacteria	number of isolated strains	bacteria	number of isolated strains
<i>Enterococcus</i>	4	<i>Enterococcus</i>	4
<i>Lactobacillus</i>	3	<i>Lactobacillus</i>	3
<i>Micrococcus</i>	8	<i>Micrococcus</i>	2
Coryneforms	4	Coryneforms	2
<i>Flavobacterium</i>	11	<i>Pseudomonas</i>	2
<i>Pseudomonas</i>	24	Unknown	5
<i>Enterobacter</i>	9		
<i>Klebsiella</i>	6		
Molds	2		
Yeasts	2		
Unknown	7		
Total	80	Total	18

Vapor concentration of AITC is 4.8 μ g/ml air

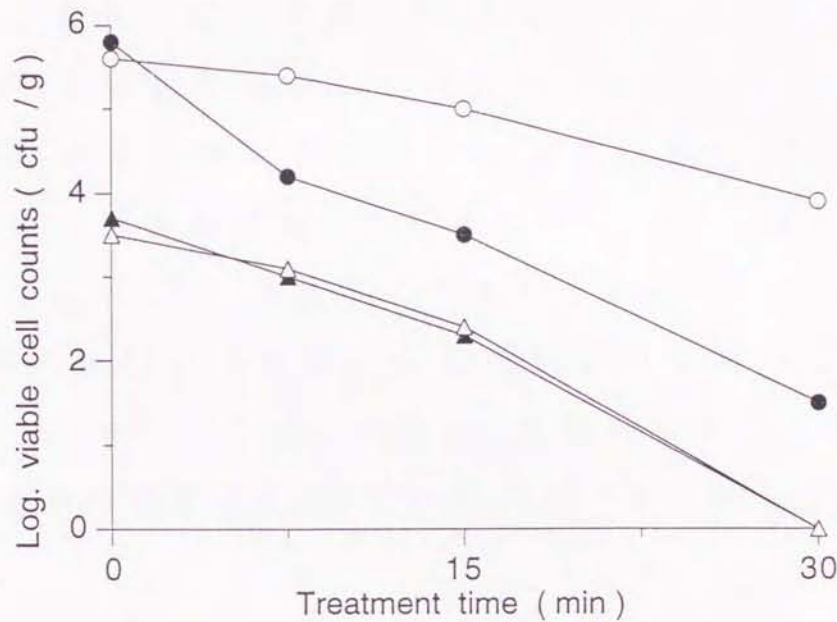


Fig. 36 Effect of allyl isothiocyanate vapor on the microorganisms on the turnips

Vapor concentration of AITC is $4.8 \mu\text{g/ml}$

○ : Gram - positives ● : Gram - negatives
△ : Coliforms ▲ : Fungi

3. AITC 処理したカブの醗酵における微生物叢の変化

Fig. 37 はガス状の AITC ($4.8 \mu\text{g/ml air}$) で 7.5、15、30 分間処理したカブを 15°C で醗酵させた場合の醗酵液中の各細菌数の変化を示したものである。

生菌数変化 (a) は無処理区及び 7.5 分間処理区のもの

は徐々に菌数が増加し、3日目には約 10^8 /mlに達し、15、30分間処理区のもの5日目に約 10^8 /mlに達した。グラム陽性菌数(b)及び乳酸菌数(c)の変化を見たところ、生菌数の変化とはほぼ同様の経過を示しており、これらの細菌が主要菌叢であることが明らかとなった。一方、亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌(d)の場合は無処理区では醗酵開始後、3日目に 10^8 /mlに達した後、6日目になって 10 /ml以下に減少した。一方、7.5、15、30分間処理した区のもの醗酵開始時においてすでに 6×10^4 、 1×10^2 、 9×10 /mlになっており、醗酵開始後4あるいは5日目にはいずれのものも 10 /ml以下に減少した。

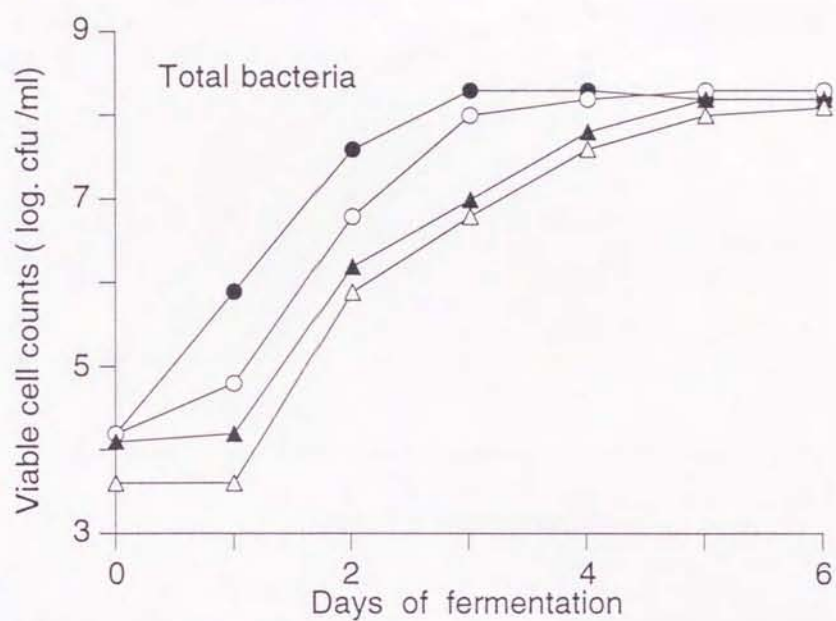


Fig.37-a Changes of viable cell counts of total bacteria on turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 μ g/ml air

● : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

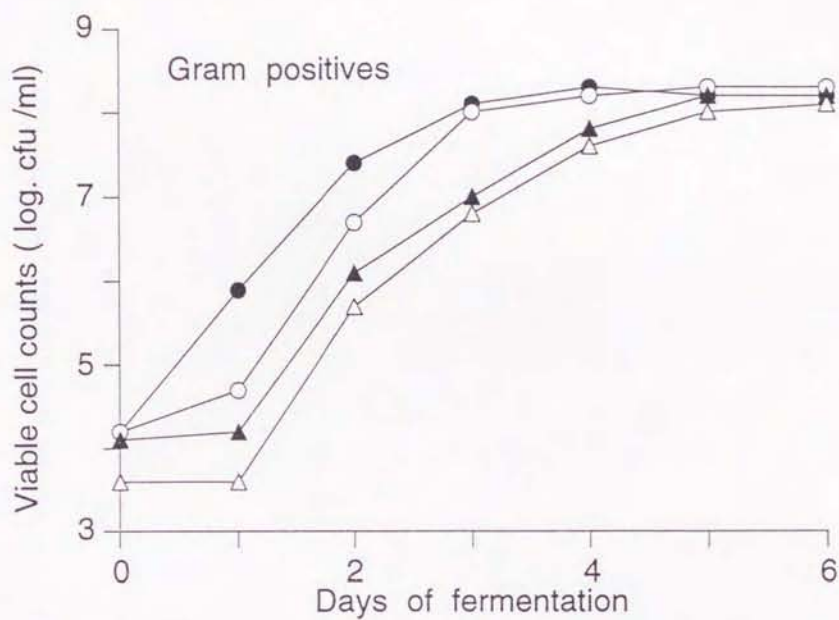


Fig.37-b Changes of viable cell counts of Gram positives on turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 $\mu\text{g/ml}$ air

- : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

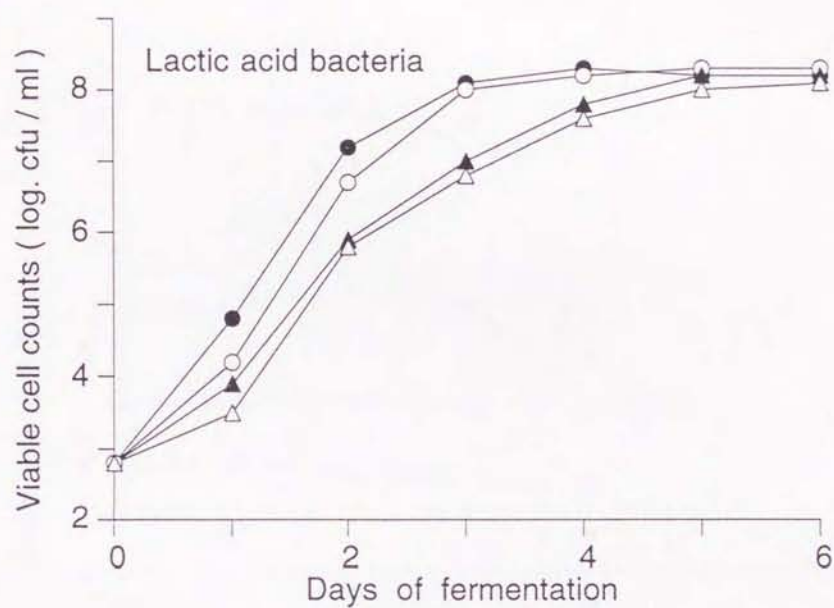


Fig. 37- c Changes of viable cell counts of Lactic acid bacteria on turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 $\mu\text{g/ml}$ air

- : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

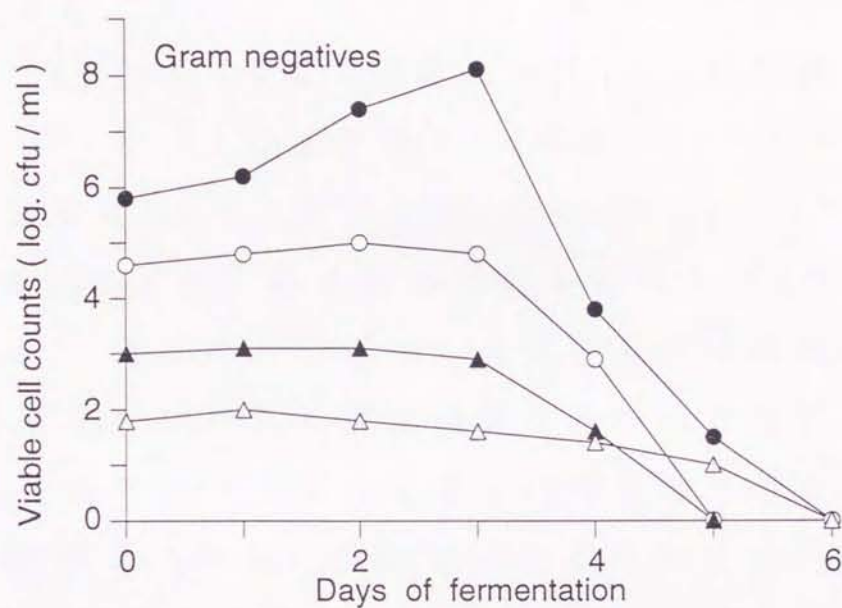


Fig. 37-d Changes of viable cell counts of Gram negatives on turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 $\mu\text{g/ml}$ air

● : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

4. AITC 処理したカブの醗酵中における pH 及び亜硝酸濃度の変化

Fig. 38 は AITC 処理したカブの醗酵中における醗酵液の pH 変化を示したものである。醗酵開始時における pH は約 6.4 で無処理のものは徐々に低下し、3、4、6 日目でそれぞれ pH 6.0、5.4、4.4 となったが、AITC 処理 ($4.8 \mu\text{g/ml air}$) を 7.5 あるいは 15 分間処理したものは無処理のものよりも急速に pH の低下がみられ、3 あるいは 4 日目には pH 4.0 となった。しかし、AITC 処理を 30 分間行なったものは無処理のものよりも pH の低下が遅延した。以上のことから、適度の AITC 処理は亜硝酸生成細菌を含むグラム陰性細菌などの生育を抑制する結果、無処理のものよりも乳酸醗酵を促進するが、過度の AITC 処理は乳酸菌の生育をも抑制するため、無処理のものよりも pH の低下が遅延することが明らかとなった。つぎに、乳酸醗酵に影響を及ぼしている亜硝酸の消長について調べた結果を Fig. 39 に示した。AITC 無処理のものは 2 日目に $90 \mu\text{g/ml}$ と最大濃度に達した後は徐々に低下し、5 日目には $1 \mu\text{g/ml}$ 以下となった。つぎに、AITC 処理を 7.5 分間行なった場合は、最大濃度が $43 \mu\text{g/ml}$ に達した後、低下し、15 分間処理を行なったものは最大濃度が $25 \mu\text{g/ml}$ に達した後、低下した。一方、AITC 処理を 30 分間行なったものはわずかな量しか亜硝酸の生成は見られなかった。

したがって、以上のことから漬物の醗酵に際してAITCで適度に野菜を気相処理することによって醗酵を制御することが可能であることを示唆する結果を得ることができた。

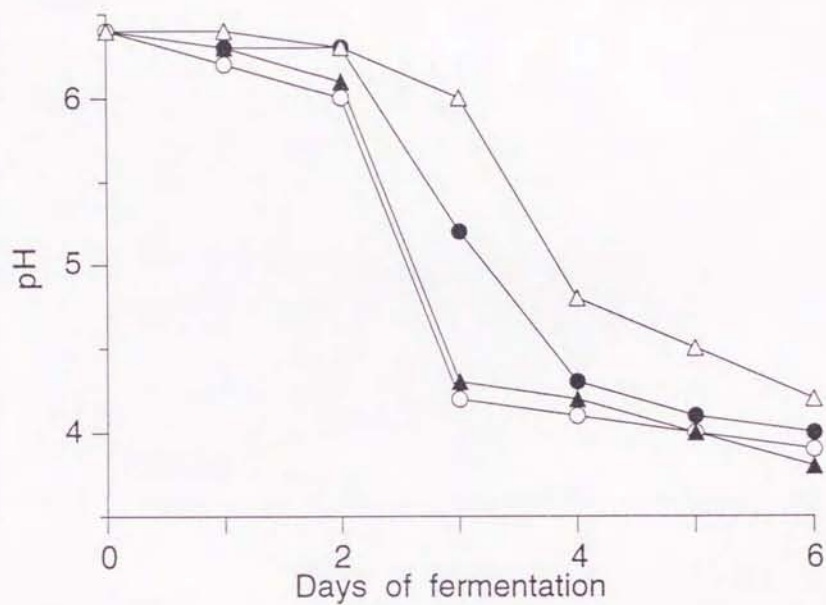


Fig. 38 Changes of pH in the brine of fermented turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 $\mu\text{g/ml}$ air

● : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

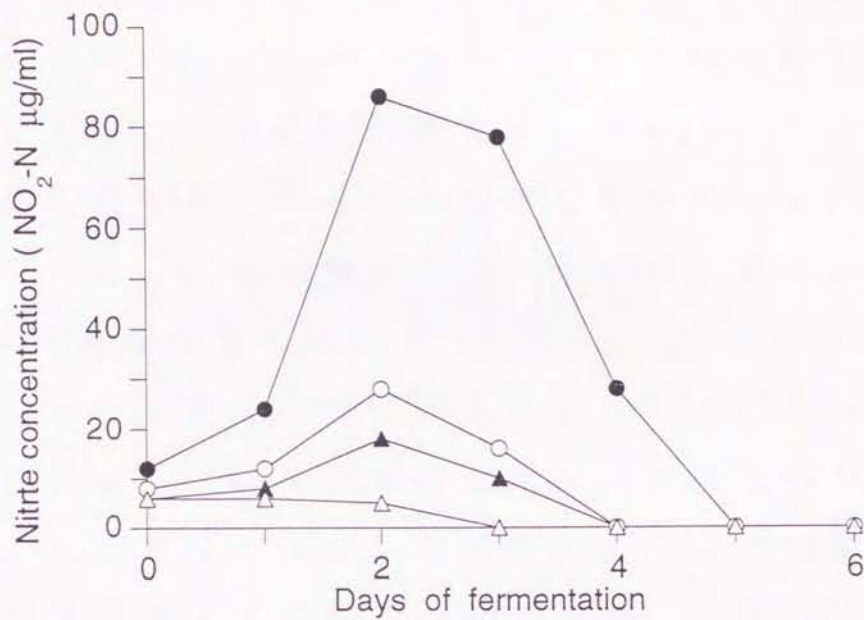


Fig. 39 Changes of nitrite concentration in the brine of fermented turnips treated with vapor of allyl isothiocyanate during fermentation at 15°C

Vapor concentration of AITC is 4.8 $\mu\text{g/ml}$ air

● : Control (non treated) ○ : treated for 7.5 min
 ▲ : treated for 15 min △ : treated for 30 min

第3節 要 約

アリルイソチオシアネートを利用した醗酵漬物の微生物制御に関する検討を行なった。主に、漬物原料野菜及び醗酵漬物より分離した菌株を対象にAITCの気相接触による抗菌活性を調べたところ、AITCは被験菌株の大部分のものを阻害した。特に、グラム陰性細菌や酵母はAITCに対して感受性が高く、0.5 mg / petri dishで増殖が阻害されたが、乳酸菌は阻害を受けにくい傾向が認められた。ガラス製デシケータにカプを入れ、ガス状のAITCを接触させる処理 ($4.8 \mu\text{g} / \text{ml air}$)を行なったところ、処理前にカプに多く見られたグラム陰性細菌や酵母の多くは減少、死滅したが、乳酸菌の多くは生残することが認められた。ガス状のAITCで適度に処理したカプを醗酵させた場合の微生物叢、亜硝酸濃度及びpHの変化について調べたところ、乳酸醗酵に影響を及ぼす亜硝酸生成細菌を多く含むグラム陰性細菌の増殖や亜硝酸の生成が抑制された一方で、乳酸菌の増殖及びpHの低下が認められた。したがって、以上のことから、漬物の醗酵に際しAITCで適度に野菜を気相処理することによって、醗酵を制御することが可能であることを示唆する結果を得ることができた。

第10章

総 括

醱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。わが国では糠漬¹⁾～¹³⁾、すぐき漬¹⁴⁾、すんき漬^{15)～23)}、かぶ漬²⁴⁾、しば漬などが知られている。

近年、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、漬物の調味液に醱酵成分を添加したものや醱酵させた野沢菜の復活に対する試みも行なわれるようになってきている。このような背景のもとで、醱酵漬物に対する関心は以前にも増して高まっており、品質の良い醱酵漬物を安定的に製造する技術の確立が望まれている。

漬物の醱酵は微生物叢、醱酵温度、食塩濃度、酸化還元電位、糖濃度など様々な要因によって影響を受けている。醱酵漬物の異常醱酵や変敗は多くの場合、醱酵温度や食塩濃度の調整不調の場合や有害微生物の混入に起因している。漬物の異常に関する報告のほとんどは製品の軟化および膨張に関するもので、亜硝酸生成菌に起因する醱酵異常に関する研究は行なわれていなかった。

本研究は、漬物の醱酵に及ぼす亜硝酸生成細菌の影響を明らかにし、良質な醱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行なわれた。

本研究で得られた成果は次のとおりである。研究成果は、ほとんどのものが新規のものであり、以下に研究の経過と得られた成果の概略を示した。

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した(第2章)。

醗酵漬物において醗酵が正常に進行しない原因について検討する際、浅漬類の保存中に亜硝酸生成細菌により多量の亜硝酸が生成する事実や亜硝酸が細菌の増殖抑制効果を有することなどに注目し、醗酵漬物の製造における醗酵初期の亜硝酸濃度の変化について調べた。その結果、正常に醗酵が進行しなかったものは通常のものより亜硝酸濃度がかなり高いことがわかった。そこで、亜硝酸生成に関与している亜硝酸生成細菌の量的な変化が漬物における微生物叢及び乳酸の生成に影響を及ぼしているものと考えられるので、はじめに亜硝酸生成細菌の計数法について検討を加えた。

亜硝酸生成細菌の計数に関してはMPN法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分離するのが困難であるなどの欠点を有していた。そこで、新たに亜硝酸生成細菌の計数と分離を可能とする方法について検討したところ、通常のプレートカウント寒天培地の表面に醗酵漬物の検液をコンラージ棒で均一に塗布した後、30℃で2～3日間培養した

後、硝酸カリウムとスルファニルアミドを含有する寒天を重層し（SAN寒天重層法）、30℃で約15分間反応させた後、0.1% NEDA（N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride）/2N塩酸を培地表面に追加し、亜硝酸の生成によりコロニー及びコロニーの周辺部が赤変したものを計数することによって亜硝酸生成細菌を測定する方法が効果的であることを見いだした。また、亜硝酸生成細菌の分離にあたっては、SAN寒天重層法とレプリカ法を併用する方法について検討を加え、プレートカウント寒天培地上のコロニーをSAN寒天を重層する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ることによって釣菌する方法を確立した。亜硝酸生成細菌において、このような方法を確立したのは今回がはじめてであり、漬物以外にも亜硝酸生成細菌を計数、分離する必要がある場合には応用が可能と考えられる。

2) 醗酵漬物中の各種乳酸菌群の選択的計数法を確立した（第3章）。

醗酵漬物において異常醗酵を解析していく上で、亜硝酸生成細菌の他に、醗酵に関与する微生物、特に乳酸菌の質的、量的変化を明らかにしていくことは極めて重要なことである。乳酸菌群の解析は代表的な菌株を無作為に釣菌し、それらを同定することによっている場合が多

く、作業はかなり煩雑となっている。乳酸菌群の分離計数に関する報告は多数あるが、乳製品を対象としたものがほとんどで、漬物を対象としたものは例がない。そこで、数種類の選択計数培地を用いて、醗酵漬物から各種乳酸菌群を分離、計数する方法を新たに見いだすことができた。

Leuconostoc 属細菌の選択計数を容易に行なう目的から、生育温度特性や漬物に多く出現する *Leuc. mesenteroides* が有するデキストラン生成の特性と混在するグラム陰性細菌の増殖阻止を考慮し、しょ糖とフェニルエチルアルコールを添加した PES (Phenyl Ethyl alcohol Sucrose) 培地を新たに考案した。

Enterococcus、*Pediococcus* 属細菌の選択計数は M-*Enterococcus* 培地を用い、37℃、3～4日間培養すると *Enterococcus* 属細菌は赤色コロニー、*Pediococcus* 属菌は白色コロニーを形成することを見いだし、それらをそれぞれ計数することを可能にした。

Lactobacillus 属細菌の選択計数は本細菌の通常の実験培地である LBS 培地では *Pediococcus* 属細菌が混在して生育することが多く、選択計数は困難であった。そこで、酢酸及び酢酸ナトリウムを添加した M-LBS 培地を新たに作成し、30℃、4日間培養することによって、*Pediococcus* 属細菌の増殖を抑制し、*Lactobacillus* 属細菌を選択的に計数することを可能とした。

以上の3種類の選択計数培地を同時に使用することに

より、漬物の醗酵における乳酸菌群の消長を明らかにすることができたが、このような方法を確立したのは本方法が初めてである。

3) 醗酵漬物における亜硝酸の蓄積と異常醗酵の関係について明らかにした(第5章)。

醗酵漬物における異常醗酵の原因について亜硝酸生成細菌、乳酸菌、亜硝酸濃度、有機酸、pHなどの変化から検討を加えたところ、原料野菜に付着している細菌叢のうち、28.7%の細菌が亜硝酸生成能を有しており、そのなかでは、*Pseudomonas*属細菌や*Enterobacteriaceae*に属する細菌が優勢であることがわかった。また、原料野菜や醗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*属細菌や*Enterobacter*属細菌は醗酵がやや進行中の状態であるpH5.0付近では亜硝酸により増殖がかなり抑制されたが、漬け始めの頃の状態であるpH6.4付近ではほとんど抑制されないことを明らかにした。

4) 過剰な亜硝酸は亜硝酸生成細菌や乳酸菌の死滅を促進させることを明らかにした(第6章)。

亜硝酸存在下における醗酵漬物関連細菌に対する死滅促進効果について検討を加えた。醗酵初期の状態(約pH5.0)で漬け液の亜硝酸濃度を0~50 $\mu\text{g/ml}$ に調整

したところ、供試菌の多くは亜硝酸濃度が高まるにつれ急速に死滅が促進され、*Pseudomonas*属細菌>*Klebsiella*属細菌>*Micrococcus*属細菌>*Enterobacter*属細菌の順に大きな影響を受けることを明らかにした。また、乳酸菌に対する亜硝酸による死滅促進効果は*Enterococcus*属細菌>*Leuconostoc*属細菌>*Pediococcus*属細菌>*Lactobacillus*属細菌の順に大きいことを明らかにした。また、醗酵初期の優勢な細菌である乳酸菌の*Leuc.mesenteroides*及び中期以降優勢な*Lact.plantarum*と亜硝酸生成細菌である*Ent.aerogenes*との混合培養を亜硝酸存在下で行なったところ、亜硝酸生成細菌である*Ent.aerogenes*の生菌数がそれぞれの乳酸菌数に比して多く、また亜硝酸濃度が高い場合は乳酸菌数の増殖及びそれにともなうpHの低下が抑制されることを明らかにした。したがって、醗酵漬物において、醗酵初期の細菌叢の構成や亜硝酸濃度の高低が醗酵に対し、大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。

5) 漬物由来亜硝酸生成細菌の亜硝酸蓄積に及ぼす温度、食塩の影響を明らかにするとともにそれらの硝酸還元活性に対し、野菜中のリンゴ酸や果糖などが比較的強い賦活作用を有していることを明らかにした(第7章)。

*Pseudomonas*属細菌は20~30℃で最も増殖が活発で亜硝酸の蓄積も10~30℃で多く、*Enterobacter*属

細菌、*Klebsiella*属細菌は30～40℃で、最も増殖が活発で、亜硝酸の蓄積も30～40℃で多いことがわかった。漬物と関係の深い食塩の影響をみると、*Pseudomonas*属細菌の場合は食塩が存在しない条件下では増殖、亜硝酸の蓄積とも多いが、食塩濃度が4%以上になると増殖は抑制され、亜硝酸もほとんど蓄積されないことが知られた。醗酵漬物の醗酵初期段階のものから分離、同定した亜硝酸生成細菌の硝酸還元酵素活性に及ぼす漬物中の有機酸の影響をみたところ、リンゴ酸や乳酸が比較的強い賦活作用を示すことを明らかにした。同様に、糖の影響をみたところ、*Pseudomonas*属細菌では、果糖が活性を促進する傾向が認められ、*Enterobacter*属細菌、*Klebsiella*属細菌ではブドウ糖や果糖に顕著な賦活作用のあることを明らかにした。

6) 原料野菜に対し、45～50℃の温和加熱処理を行なうことにより、野菜の物性を損なうことなく、亜硝酸生成細菌の増殖を抑制し、正常な醗酵を行なわせる方法を開発した(第8章)。

醗酵漬物より分離した細菌を対象に、温和加熱処理が細菌の死滅、細胞内容成分の漏洩及び漬物の醗酵における亜硝酸の蓄積に及ぼす影響について調べたところ、原料野菜を50℃で温和加熱処理した場合、グラム陽性細菌と比較して亜硝酸生成細菌の多くを含むグラム陰性細菌は死滅しやすい傾向のあることを明らかにした。なか

でも、漬物における亜硝酸生成細菌の代表的な細菌の一つである *Pseudomonas* 属細菌が特に熱感受性が高く、45℃、15分の加熱処理で1/100に減少した。また、グラム陰性細菌の多くは45℃の温和加熱処理で細胞成分の漏洩が認められ、細胞膜の損傷やRNAの漏出が起きていることが推察された。しかし、グラム陽性細菌からの漏洩はわずかであり、グラム陽性細菌は温和加熱処理によってあまり損傷を受けないことがわかった。したがって、温和加熱処理により亜硝酸生成細菌が抑制され、乳酸菌の増殖を安定化させ、正常な醗酵が進行するのに都合の良い状態にすることが可能であることを明らかにした。

7) カラシからの主要な抽出成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) を利用することにより漬物の醗酵制御を行なう方法を確立した (第9章)。

醗酵漬物の原料野菜となる菜類、大根、カブなどにはカラシ油配糖体が含まれており、塩漬け工程で自家酵素により揮発性のイソチオシアネートが生成されることが知られている。揮発性イソチオシアネートは抗菌性を有しているものが多く、醗酵漬物の製造に影響を及ぼしているものと考えられているが、明確にはされていなかった。そこで、揮発性イソチオシアネートの中でも主要なAITCの漬物の醗酵に及ぼす影響について微生物の観点から検討を加えた結果、AITCはグラム陰性細菌や真菌

に対しては強い抗菌力を有するが、グラム陽性細菌、特に乳酸菌に対してはあまり抗菌力を有しないことを見いだした。以上のことから、AITCにより亜硝酸生成細菌を多く有するグラム陰性細菌を抑制するとともに乳酸菌の増殖を促進させることで漬物の醗酵を安定的に進行させることを可能とした。

以上のように、本論文で示された醗酵漬物における亜硝酸の生成と制御に関する研究は新規なものであり、その結果は実際の醗酵漬物の製造における制御技術の一つとして今後生かされていくものと考えられる。

要 訳

本論文は醗酵漬物の異常醗酵の原因追及とその対策としての微生物制御技術について研究を行なった結果を論じた。

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、品質的に劣った製品が出現することが知られている。この原因について報告されたものの多くは食塩、醗酵温度、酵母の増殖などに関して論じられたものであり、亜硝酸の蓄積に注目して行なわれた研究はほとんど見当たらない。

そこで本研究は漬物の醗酵異常に及ぼす亜硝酸の影響を明らかにするとともに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行なわれた。本研究で得られた成果のほとんどは新しい知見であり、以下に研究の成果の要約を示した。

1) 漬物の異常醗酵の原因となる亜硝酸の蓄積に関与する亜硝酸生成細菌の計数法及び分離法を確立した(第2章)。

醗酵漬物中の亜硝酸生成細菌の選択計数法として硝酸カリウムとスルファニルアミドを用いたSAN寒天重層法を開発したが、本方法は今回が初めてであり、漬物以外にも亜硝酸生成細菌を計数、分離する必要がある場合に

は応用が可能で汎用性がある技術と考えられる。

2) 数種の培地を用いた醗酵漬物中の各種乳酸菌群の選択的計数法を確立した(第3章)。

乳酸菌群の分離計数に関する報告の多くは乳製品に関するもので、漬物を対象としたものはほとんど見当たらない。そこで、*Leuconostoc*属細菌の選択計数に有効なPES培地を新たに考案するとともにそれに加えて、LBS改変培地、M-Enterococcus培地を使用することにより、醗酵漬物中の各種乳酸菌群の選択的計数を可能としたが、このような方法を確立したのは今回の大きな成果の一つである。

3) 醗酵漬物における亜硝酸の蓄積と異常醗酵の関係について明らかにした(第5章)。

醗酵初期の亜硝酸生成細菌(*Pseudomonas*属細菌、大腸菌群など)数が乳酸菌数に比して多く、また、生成された亜硝酸濃度が高い場合には乳酸菌の増殖及び酸の生成が抑制され、醗酵異常を起こすことを明らかにした。

4) 過剰な亜硝酸は亜硝酸生成細菌や乳酸菌の死滅を促進させることを明らかにした(第6章)。

亜硝酸存在下における醗酵漬物関連細菌に対する死滅促進効果について検討を加え、醗酵初期では*Pseudomo*

nas 属細菌 > *Klebsiella* 属細菌 > *Micrococcus* 属細菌 > *Enterobacter* 属細菌の順に大きな影響を受け、乳酸菌では *Enterococcus* 属細菌 > *Leuconostoc* 属細菌 > *Pediococcus* 属細菌 > *Lactobacillus* 属細菌の順に大きいことを示し、醗酵初期の細菌叢の構成や亜硝酸濃度の高低が醗酵に対し、大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。

5) 漬物由来亜硝酸生成細菌の亜硝酸蓄積に及ぼす温度、食塩の影響を明らかにするとともにそれらの硝酸還元酵素活性に対し、野菜中のリンゴ酸やブドウ糖、果糖などが賦活作用を有していることを明らかにした(第7章)。

6) 原料野菜に対し、45～50℃の温和加熱処理を行なうことにより、漬物の歯切れを損なうことなく、亜硝酸生成細菌の増殖を抑制し、正常な醗酵を行なわせる方法を開発した(第8章)。

原料野菜を50℃で温和加熱処理した場合、グラム陽性細菌と比較して亜硝酸生成細菌の多くを含むグラム陰性細菌は死滅しやすい傾向のあることを明らかにした。また、温和加熱処理でグラム陰性細菌の細胞成分の漏洩を認め、細菌細胞膜の損傷やRNAの漏出が起こっていることを明らかにすることができた。以上のことから、温和加熱処理により醗酵制御を行なうことが可能であること

を示した。

7) カラシからの主要な抽出成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) を利用することにより漬物の醗酵制御を行なう方法を確認した (第9章)。

漬物の原料野菜に多く含まれている揮発性イソチオシアネートは抗菌性を有しているものが多く、醗酵漬物の製造に影響を及ぼしているものと考えられているが、明確にはされていなかった。今回、主要な辛味成分であるAITCの漬物の醗酵に及ぼす影響について調べた結果、AITCはグラム陰性細菌や真菌に対しては強い抗菌力を有するが、グラム陽性細菌、特に乳酸菌に対してはあまり抗菌力を有しないことを見だし、これを利用することにより、漬物の醗酵を安定的に進行させることを可能とした。

以上のように、本論文で示された醗酵漬物における亜硝酸の生成と制御に関する研究は全く新規なものであり、その結果は実際の醗酵漬物の製造における制御技術の一つとして今後生かされていくものと考えられる。

謝 辞

本論文をまとめる機会を与えていただくとともに終始ご指導ご鞭撻をいただきました岩手大学大学院連合農学研究科・弘前大学農学部教授中村信吾博士に厚く御礼申し上げますとともに、ご熱心にご校閲してくださいました山形大学教授上木勝司博士、弘前大学教授奥野智旦博士、弘前大学教授武田潔博士、岩手大学教授種谷新一博士ならびに弘前大学助教授戸羽隆宏博士に厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたり、ご指導いただきました元東京都農業試験場長小川敏男博士に深く感謝申し上げます。また、論文の執筆にご指導をいただいた元農林水産省食品総合研究所長渡辺篤二博士に深く感謝いたします。更に、昭和女子大学教授小崎道雄博士ならびに東京農業大学教授駒形和男博士には漬物に関連する微生物や乳酸菌に関して有益な示唆を与えてくださいました。また、本研究は多くの漬物業界の方々の惜しみないご協力の上に行なわれました。心から感謝申し上げます。

東京都立食品技術センター所長齋尾恭子博士ならびに元・現東京都立食品技術センターの研究室の方々、特に鈴木 普、佐藤 匡、青木睦夫、沼田邦雄の諸氏および職員の皆様には長期間暖かさを持って本研究を補佐してくださいました。心から感謝申し上げます。

1995年3月11日

著者

引用文献

- 1) 宮尾茂雄：食品と科学，34，(9)，99 (1992)
- 2) 長坂熊吉：農化，4，712 (1930)
- 3) 大谷義夫：醸造，10，1009 (1932)
- 4) 山崎四郎・橋本英子：発協，17，369 (1959)
- 5) 西原さつき・久野和子・村田紀代子：生活科学，
5，7 (1960)
- 6) 伊藤 寛・海老根英雄：食糧研報，18，23
(1964)
- 7) 支倉さつき・村田紀代子・森 和代：生活科
学，7，19 (1966)
- 8) 今井正武・後藤昭二：農化，58，545 (198
4)
- 9) 今井正武・平野 進・饗庭美恵子：農化，
57，1105 (1983)
- 10) 小崎道雄・小原直弘：農化大会講演要旨集，p.129
(1964)
- 11) 小崎道雄：東京農業大学創立70周年記念論文集，
p.163 (1961)
- 12) 山縣 敬：味噌の科学と技術，No.301，2
(1979)
- 13) 今井正武・平野 進・饗庭美恵子：農化，57，
1113 (1983)
- 14) 神山 勝・小泉幸通・柳田藤治：月刊食品，27，
71 (1983)

- 15) 中浜敏雄：「乳酸菌の研究」（北原覚雄編）（東京大学出版会，東京），p.507(1957)
- 16) 窪田 譲・松田嗣夫・窪田三郎：長野県衛生研究所報告，11，1（1957）
- 17) 中山大樹：農化，23，497（1951）
- 18) 中山大樹・小池弘子：醗工，43，157（1965）
- 19) 中山大樹・小池弘子：醗工，43，799（1965）
- 20) 板橋雅子：調理科学，15，226（1982）
- 21) 板橋雅子：調理科学，15，229（1982）
- 22) 板橋雅子：日食工誌，30，719（1983）
- 23) 板橋雅子・高村範子：日食工誌，32，120（1985）
- 24) 板橋雅子・高村範子：日食工誌，32，208（1985）
- 25) 円谷悦造・渡辺 篤・正井博之：日食工誌，29，202（1982）
- 26) Pederson, C. S.: *New York State Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 168*(1930)
- 27) Etchells, J. L. and Jones, I. D. : *J.Bacteriol.* 52, 593(1946)
- 28) Pederson, C. S. and Ward, L.: *New York State Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 288*(1949)
- 29) Bell, T. A. and Etchells, J. L. : *Appl.Microbiol.* 4, 196(1956)
- 30) Hamilton, I. R. : *Appl.Microbiol.* 9, 128 (1961)
- 31) Pederson, C. S. and Albury, M. N. : *Food Technol.* 16, 126(1962)

- 32) Fleming, H. P., Etchells, J. L., Thompson, R. L. and Bell, T. A. : *J. Food Sci.*, 40, 1304 (1975)
- 33) Fleming, H. P., Thompson, R. L., Etchells, J. L., Kelling, R. L. and Bell, T. A. : *J. Food Sci.*, 38, 504 (1973)
- 34) Fleming, H. P., Thompson, J. L., Etchells, J. L., Kelling, R. L. and Bell, T. A. : *J. Food Sci.*, 38, 499 (1973)
- 35) Kim, H. S., Whang, K. C. and Lee, K. H. : *Bull. Sci. Res. Inst. Korea*, 5, 65 (1960)
- 36) 河 徳 模 : 発酵と工業, 37, 202 (1979)
- 37) Woodburn, S. L., Ro, M. and Sandine, W.E. : *J. Food Sci.*, 44, 873 (1979)
- 38) テイカカルキ・岡田早苗・馬場 徹・伊藤 寛・小崎道雄 : 日食工誌, 30, 357 (1983)
- 39) Conrad, E.: *Arch., Hys.* 29, 56 (1897)
- 40) Butchagen, E.: *Centr. Bact., Abt.*, 11, 54 (1904)
- 41) Nout, M.J.R. and Rombouts, F.M.: *J. Appl. Bacteriol.* 73, 136s (1992)
- 42) Stamer, J.R.: *J. Developments in Food Microbiology*, 3, 67 (1988)
- 43) Fleming, H.P., Etchells, J.L. and Costilow, R.N.: *Appl. Microbiol.*, 30, 1040 (1975)
- 44) Hall, C.B., and Hicks, J.R. : *J. Food Sci.*, 42, 549 (1977)

- 45) 柳原紀子・菰田 快・米山 平・山田正一：食衛誌, 4, 343 (1963)
- 46) 土壤微生物研究会編：土壤微生物学実験法（養賢堂, 東京） p.198(1981)
- 47) 有賀秀子・大塚 勉・服部 聡・大西拓弥・祐川金次郎：日食工誌, 31, 710 (1984)
- 48) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore(1974)
- 49) Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E and Holt, J.G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol.2, Williams & Wilkins Co., Baltimore(1986)
- 50) Gibbs, B.M. and Skinner, F.A., *Identification Methods for Microbiologists Part A*, Academic Press, London and New York(1966)
- 51) Lee, C.H., Adler-Nissen, J. and Barwald Gunter, *Lactic acid Fermentation of Non-dairy food and Beverages*, The Harn Lim Won, Seoul(1994)
- 52) Prouty, C.C. and Glenn, W.E.: Proc. 35th Ann. Meeting West. Div. Amer. Dairy Sci. Assoc., (1954)
- 53) Mayeux, J.M., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. : *J. Dairy Sci.*, 45, 656 (1962)
- 54) McDonough, F.E., Hargrove, R.E. and Tittsler, R.P.: *J. Dairy Sci.*, 45, 656 (1962)

- 55) 伊藤 寛ほか：微生物の分離法・山崎一英ほか
編 (R&Dプランニング, 東京), p.307(1986)
- 56) Slantz, A.D. and Bartley, P.M: *J.Bact.*, 74, 591
(1957)
- 57) Buckwall, S.W and Hartman, J.D.: *Appl. Microbiol.*, 12,
18(1964)
- 58) Kempton, R.D and San Clemente, T.M.: *Appl. Microbiol.*:
7, 362(1959)
- 59) 光岡知足：腸内菌叢の検索法・腸内菌の世界 (叢文
社, 東京), p53(1980)
- 60) 河津大輔・大島直子・奥積昌世・藤井建夫：日食微
誌, 11, 125 (1994)
- 61) 山下市二・田村太郎・吉川誠二・高波修一：農化,
48, 165 (1974)
- 62) Cowan, S.T.: Cowan and Steel's Manual for
the Identification of Medical Bacteria 2nd Ed.,
(Cambridge Univ. Press), (1974)
- 63) Norman, R.S. and Roger, A.Y.: *Am. J. Vet. Res.*, 34,
133(1973)
- 64) 裕川金次郎・松本多計治：栄養と食糧, 28, 389
(1975)
- 65) Moran, D.M., Tannenbaum, S.R. and Archer, M. C.: *Appl.*
Microbiol., 30, 838(1975)
- 66) Riha, Jr, W.E. and Solberg, M.: *J. Food Sci.*, 40, 443
(1975)

- 67) Tompkin, R.B., Christiansen, L.E. and Shaparis, A. B.:
Appl. Environ. Microbiol., 35, 59 (1978)
- 68) Tompkin, R.B., Christiansen, L.E. and Shaparis, A. B.:
Appl. Environ. Microbiol., 37, 351 (1979)
- 69) Greenberg, E.P. and Becker G.E.: *Can. J. Microbiol.*, 23,
903 (1977)
- 70) 宮尾茂雄・青木睦夫: 日食工誌, 25, 327 (1978)
- 71) 畑 明美・緒方邦安: 日食工誌, 25, 280 (1978)
- 72) Ruitz-Herrera, J., Showa, M. K., Demoss, J. A.: *J. Bacteriol.*,
97, 1291 (1969)
- 73) Ruitz-Herrera, J., Demoss, J. A.: *J. Bacteriol.*, 98, 1056
(1969)
- 74) Ruitz-Herrera, J., Demoss, J. A.: *J. Bacteriol.*, 99, 720
(1969)
- 75) Radcliff, B. C., Nicholas, D. J. D.: *Biochem. Biophys. Acta*,
153, 131 (1968)
- 76) 宮尾茂雄・青木睦夫: 日食工誌, 26, 444 (1979)
- 77) 宮尾茂雄: *New Food Industry*, 26, (2), 61
(1984)
- 78) 小川敏男: 漬物製造学 (光琳, 東京), p.252 (1989)
- 79) Hurst, A., Hughes, A., Collins-Thompson, D. L. and Shah,
B. G.: *Can. J. Microbiol.* 20, 1153 (1970)
- 80) 土戸哲明・中川良勝・岡崎光雄・芝崎 勲: 発酵工
学, 50, 93 (1972)

- 81) 土戸哲明・岡崎光雄・芝崎 勲：発酵工学, 50,
341 (1972)
- 82) 阿南功一・紺野邦夫・田村善藏・松橋通生：化学的測定,
基礎化学実験法5(丸善, 東京), p.171(1976)
- 83) 福井作蔵：還元糖の定量法 (学会出版センター, 東
京), p.50 (1969)
- 84) 川岸舜郎：日食工誌, 32, 836 (1985)
- 85) Beuchat, L.R.: *J. Food Sci.*, 41, 899(1976)
- 86) Goi, H., Inoue, S., and Iwanami, Y.: *J. Antibact. Antifung.
Agents*, 13, 199(1985)
- 87) Kanemaru, K. and Miyamoto, T.: *Nippon Shokuhin Kogyo
Gakkaishi*, 37, 823(1990)
- 88) 太田義雄・高谷健市：日食工誌, 29, 672 (1982)
- 89) Itoh, H., Yoshida, R., Mizuno, T., Kudo, M., Nikkuni, S. and
Karki, T.: *Rept. Natl. Food Res. Inst.*, No. 45, 33 (1984)
- 90) Karki, T., Itoh, H., Nikkuni, S., Ohono, M. and Ebine, H.:
Rept. Natl. Food Res. Inst., No. 43, 40(1983)