

# 浅漬けにおける亜硝酸生成と微生物の挙動

宮尾茂雄・青木睦夫

Relationship between Nitrite Production  
and the Behavior of Microorganisms  
in "Asazuke" ( low salted pickles )

Shigeo MIYAO and Mutsuo AOKI

## Summary

The relationship between nitrite production and the behavior of microorganisms in "Asazuke" (low salted pickles) made of cucumber, radish and Komatsuna was investigated.

Results obtained were as follows:

1. The maximum concentration of nitrite in "Asazuke" made of cucumber, radish and cabbage held at 20°C went up to 4, 68, 6.9 ppm respectively after nitrite content increased rapidly with nitrite reducing bacterial growth.

Then nitrite and *Pseudomonas*, coliforms which were dominant nitrate reducing bacteria at the initial stage of preservation decreased and disappeared caused by lowering of pH accompanied by the growth of lactic acid bacteria.

2. On the other hand, the concentration of nitrite went up to 230 ppm after 2 days at the case of Komatsuna, the lowering of pH and the growth of lactic acid bacteria were not recognized. The dominant bacteria became coliforms, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and Coryneform bacteria after 6 days, then "Asazuke" made of Komatsuna were putrefied finally.

3. Therefore, it could be assumed that the nitrite concentration of "Asazuke" affected the microflora in it, especially the growth of lactic acid bacteria and the production of acids.

4. The nitrate reducing bacteria isolated from "Asazuke" were *Bacillus*, *Micrococcus*, Coryneform bacteria, *Staphylococcus*, in Gram positives and *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae in Gram negatives.

Within them, *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae were dominant nitrate reducing bacteria in "Asazuke".

5. As a result that the major nitrate reducing bacteria were identified, they were *Ps. fluorescens* and *Ent. aerogenes*.

6. The effects of temperature, salt and lactic acid on the production of nitrite by the growth of major nitrate reducing bacteria were studied.

Therefore, it was recognized that the production of nitrite by *Enterobacter* was more at middle temperature (30°C) but by *Pseudomonas* at low temperature (5°C).

*Pseudomonas* was liable to be more affected by salt and lactic acid than *Enterobacter*.

## I. 緒 言

亜硝酸塩は体内におけるニトロソアミン生成の前駆体物質として知られており<sup>1)~3)</sup>、植物体あるいは微生物が有する硝酸還元酵素によって主に生産されることがわかっている。ニトロソアミンは発がん物質の一種でもあるので、健康上の観点から、食物由来の亜硝酸生成に関する多くの研究報告がみられる。谷村ら<sup>4)</sup>、Tannebaumら<sup>5)</sup>は、唾液中の亜硝酸は、口内の細菌によって食物中に含有される硝酸塩から生成されることを報告し、村松ら<sup>6)</sup>は口内での亜硝酸生成と常在菌叢を調べ、*Micrococcus*, *Corynebacterium* および *Veillonella* が重要な役割をはたしていることを報告している。同様に、丸山ら<sup>7)</sup>は、口内の亜硝酸生成細菌として *Bacillus coagulans* に注目し、種々の条件下における硝酸塩および硝酸塩の還元について報告している。小西ら<sup>8)~12)</sup>は、山廃酒母の亜硝酸生成菌として *Pseudomonas* を分離し、それらに関する詳細な研究報告をし、同様に、村上ら<sup>13)</sup>は酒母中より主力菌群として *Bacillus mesentericus* を、分離して報告している。畜産関係においては、いわゆる「硝酸中毒」との関連からの報告が多く、その原因である亜硝酸のルーメン内生成に関して Wright ら<sup>14)</sup>、篠崎<sup>15)</sup>の総説や中村ら<sup>16)</sup>の報告がみられる。

野菜加工品に関しては、Hall ら<sup>17)</sup>はキャロットジュースにおける亜硝酸生成について検討を加え、保存中に30ppmの亜硝酸が生成されたことを報告している。漬物においては畠ら<sup>18)~24)</sup>が亜硝酸生成に関する詳細な報告をおこなっているが、微生物と亜硝酸の生成に関しては、松井ら<sup>25)</sup>の野菜を塩漬けにした場合に、漬け汁中に亜硝酸が生成され、これは細菌によることの報告例および柳原ら<sup>26)</sup>の各種そ菜汁液中の硝酸および亜硝酸塩含量とともに亜硝酸生成菌について調べ、桿菌が関連しているとの報告例はあるが、微生物叢との関連から検討した例はあまりみあたらない。そこで、著者らは漬物における亜硝酸の生成と各微生物群の挙動に注目し検討を加え若干の知見を得たので報告する。

## II. 実験材料および方法

### 1. 試 料

本試験に用いた原料野菜のキュウリ、ダイコン、コマツナおよびキャベツは市販されているものを購入して用いた。

### 2. 浅漬けの調製

原料野菜を水道水で良く水洗浄し、キュウリ、コマツナはそのまま、ダイコンは約5mmの厚さで輪切りにし、キャベツは四つ割りにした後それぞれの原料野菜が約500gになるように調整した。つぎに、原料野菜をポリエチレン袋にいれ、原料野菜に対し3%の食塩をよくまぶし3時間放置し、しんなりさせた後、原料野菜の半重量と等量の3%の食塩水を加え、浅漬けを調製した。

### 3. 浅漬けの保存

浅漬けは20℃, 5℃に保存し、保存経過中における亜硝酸塩および微生物検査に供試した。

### 4. 亜硝酸イオンの定量

亜硝酸イオンの定量方法の概略はFig. 1に示すとおりであるが、検液に到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アルミニナクリームで処理を行い、培養液を出発材料とする場合にはNorman ら<sup>27)</sup>の方法を改良した祐川ら<sup>28)</sup>の除蛋白剤(A: 90g チオシアノ酸アンモニウム, 80g 塩化第二水銀/11, B: 250g 酢酸亜鉛/11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(20g スルファニルアミド、リン酸(85%)50ml/11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540nmで比色定量することによって行った。

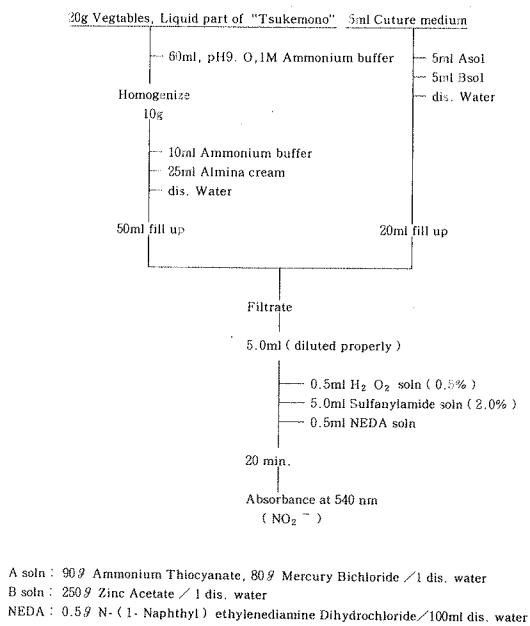
### 5. 各微生物群の計数

試験に供した漬物からの微生物検査に用いる試料原液の調製は、各々の試料から10mlを採取し、滅菌生理的食塩水90mlの入った滅菌ビンに投入し、良く混和することによって得た。

生菌数は、各々の試料原液の10倍段階希釈を行った後、標準寒天を用いた表面塗抹法により、30℃, 48時間培養後、出現コロニーを計数し、生菌数とした。グラム陽性菌数は、選択培地として、0.25%になるようβ-フェニルエチルアルコールを添加した標準寒天を用い、30℃4日間培養後出現したコロニーを計数し、本菌数とした。グラム陰性菌数は、CVT寒天を用い、30℃, 48時間培養後、出現した赤変コロニーを計数し本菌数とした。

### 6. 分離菌株の同定

分離菌株の属あるいは種の同定にあたっては、菌株の運動性、カタラーゼ、オキシダーゼなど一般項目について調べ、主にBergey's Manual<sup>29)</sup>, Cowan<sup>30)</sup>の成書

Fig. 1. Analytical method of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

に準拠して行った。

## 7. 硝酸還元活性の測定

硝酸還元活性の測定に際しては、目的菌の一液培養液を遠心分離によって集菌した後滅菌生理的食塩水で洗浄したものと菌液とし、それを適当に希釈したもの2.5mlを2.0mlのリン酸緩衝液(1/15M, pH 7.2)の入った小試験管に注加し、混合してから30℃で5分間後に0.5mlの硝酸ナトリウム溶液(1/10M)を入れ、反応を開始させ、目的の時間経過後にすばやく反応液の0.5mlを9.5mlの沸騰水に入れ反応を停止させた。そして、前述の方法に従って亜硝酸の生成量を測定した。

## III. 実験結果

### 1. 各種浅漬けにおける亜硝酸および細菌数変化

キュウリ、ダイコン、コマツナ、キャベツの浅漬けを調製し、20℃および5℃に保存した場合における亜硝酸、pH、総生菌数、グラム陽性菌、グラム陰性菌の変化について検討を加え、以下に示す結果を得た。

キュウリの例について20℃保存の結果はFig. 2に、5℃保存の結果はFig. 3に示した。20℃に保存した場合は、保存開始後1日目で漬け液中の亜硝酸の生成は4ppm

のピークに達したが、細菌の急速な増殖に伴い2日目にはpH 4.35となり、亜硝酸は消滅した。キュウリそのものの亜硝酸は漬け液の場合と同様に1日目にピークに達したが、漬け液における含量よりも低く、0.5ppmに達したに過ぎなかった。3日目以降は生菌数は10<sup>9</sup>/mlに達し、グラム陽性菌が主要菌となるとともにpHはさらに低下し、4日目にはpH 3.95となり、5日目にはグラム陰性菌は死滅した。

5℃保存の場合は、保存経過に従い、亜硝酸は漬け液で4日目で5.8ppm、8日目では18ppmに達し、キュウリそのものは、4日目で1.2ppm、8日目では4.8ppmに達した。

生菌数は8日目には10<sup>8</sup>/mlに達したが、pHの低下は5.6にとどまり、グラム陰性菌も8日目まで10<sup>6</sup>/mlであった。

ダイコンの例については20℃保存の結果はFig. 4に、5℃保存の結果はFig. 5に示した。20℃に保存した場合は、保存開始後2日目で漬け液中の亜硝酸の生成は68ppmのピークに達したが、細菌の増殖に伴い4日目にはpH 4.3、8日目にはpH 4.05となり、亜硝酸は同様に、4日目で18ppmとなり、8日目には消滅した。ダイコンそのものの亜硝酸は漬け液の場合と同様に2日目にピークに達したが、漬け液における含量よりもかなり低く、8.5ppmに達したに過ぎなかった。一方、生菌数は2日目に10<sup>8</sup>/mlに達し、グラム陽性菌が主要菌となるとともにpHは低下し、2日目以降はグラム陰性菌は減少傾向を示し、6日目には10<sup>2</sup>/mlとなった。

5℃保存の場合、亜硝酸は漬け液で5日目で4ppm、10日目では12.5ppmに達したに過ぎなかった。ダイコンそのものは、さらに低く10日目で2.5ppmにとどまった。

生菌数は8日目には10<sup>8</sup>/mlに達したが、pHは6.0前後の変動に終始し、グラム陰性菌は減少することもなく、8日目には10<sup>7</sup>/mlに達した。

コマツナの例については20℃保存の結果はFig. 6に、5℃保存の結果はFig. 7に示した。20℃に保存した場合は、キュウリ、ダイコンの場合と異なり、亜硝酸は減少することなく、漬け液で2日目で235ppm、4日目で565ppm、6日目においては730ppmにも達し、ついには変敗した。コマツナそのものの亜硝酸も漬け液の場合と同様に上昇し、6日目には540ppmに達した。一方、生菌数は2日目に10<sup>8</sup>/mlを超えたが、6日目に達しても、pHは低下せずに、逆に上昇し6.6になった。従って、グラム陰性菌の減少も生じることなく、10<sup>8</sup>/mlと高い菌数を示した。

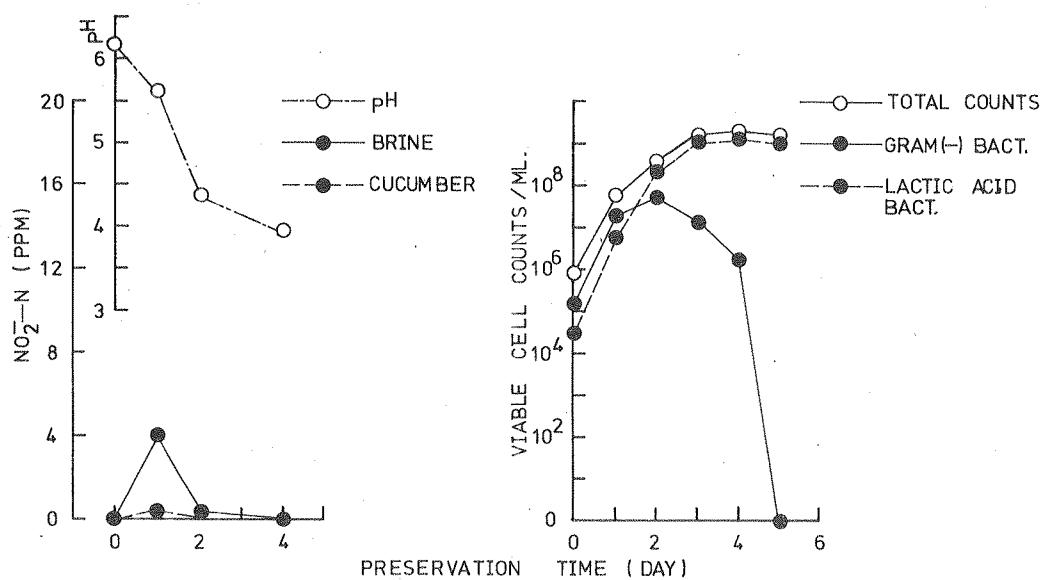


Fig.2 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the cucumber or brine during preservation at  $20^\circ\text{C}$ .

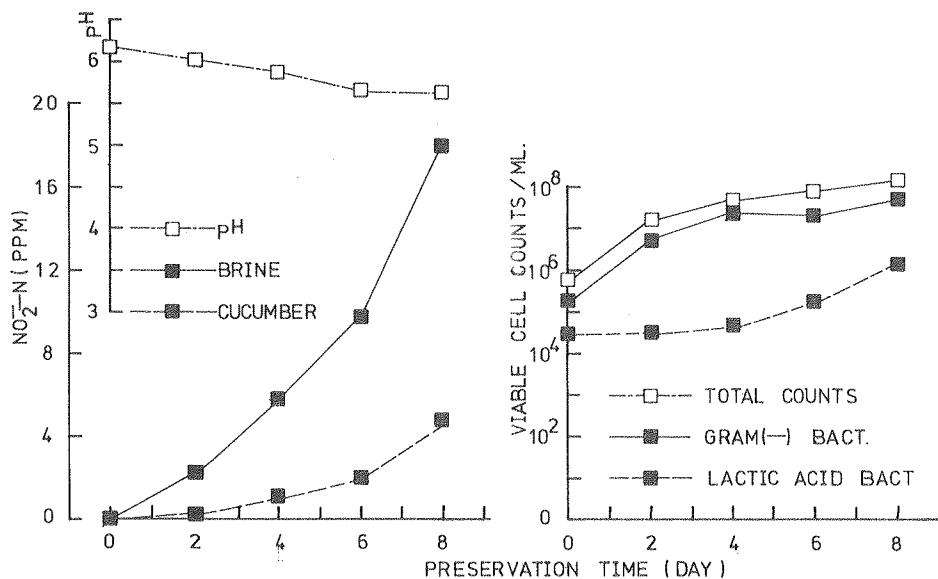


Fig.3 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the cucumber or brine during preservation at  $5^\circ\text{C}$ .

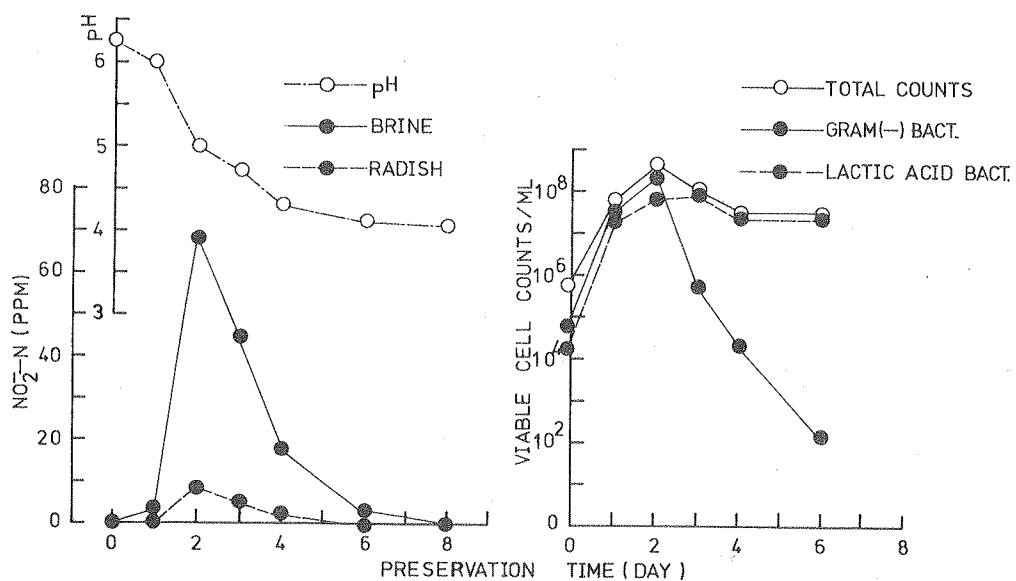


Fig.4 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the radish or brine during preservation at  $20^\circ\text{C}$ .

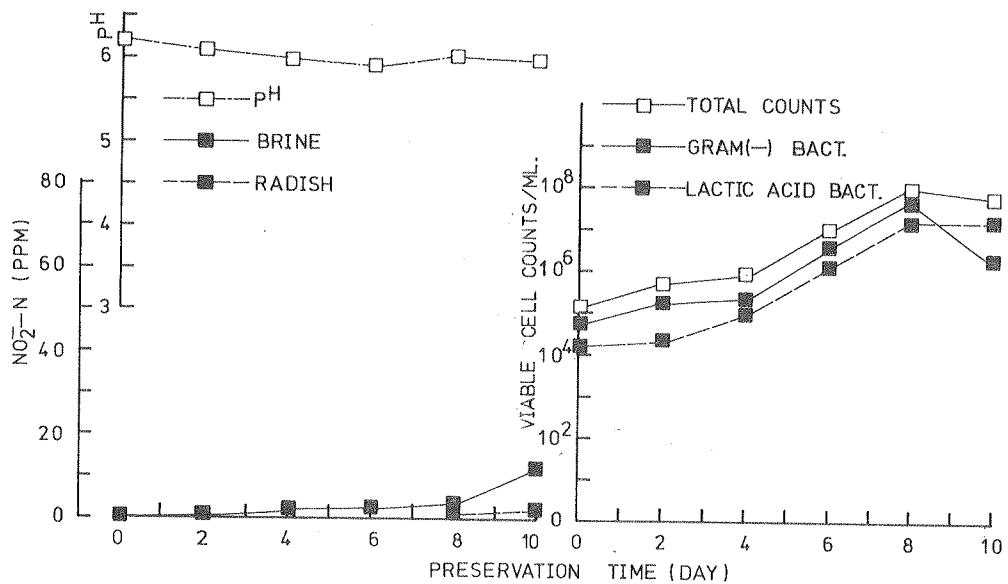


Fig.5 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the radish or brine during preservation at  $5^\circ\text{C}$ .

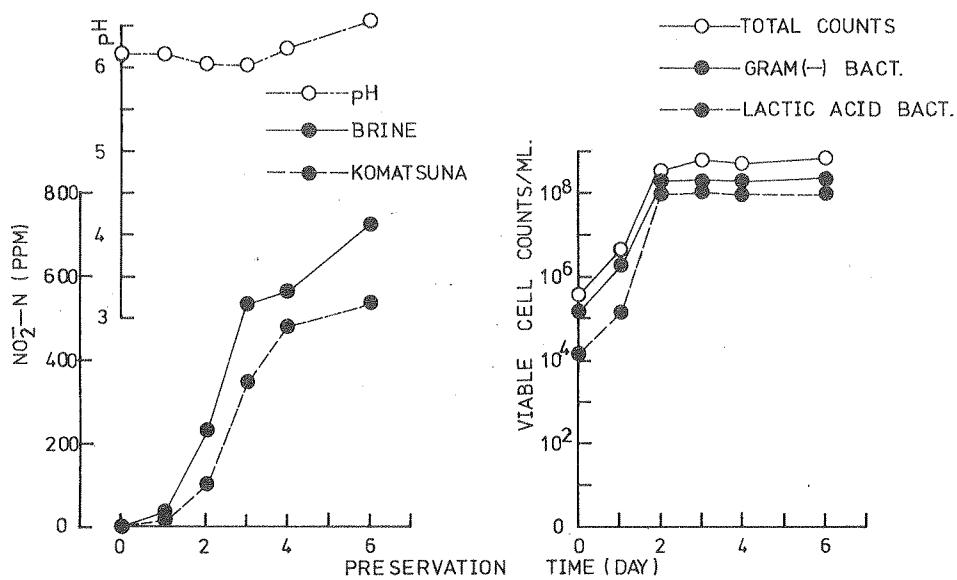


Fig.6 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the komatsuna or brine during preservation at  $20^\circ\text{C}$ .

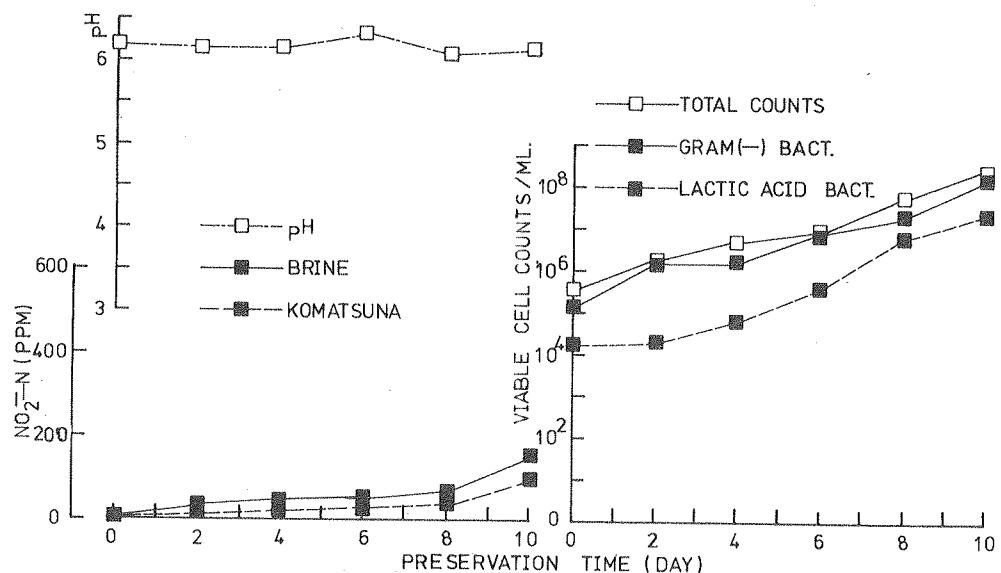


Fig.7 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the komatsuna or brine during preservation at  $5^\circ\text{C}$ .

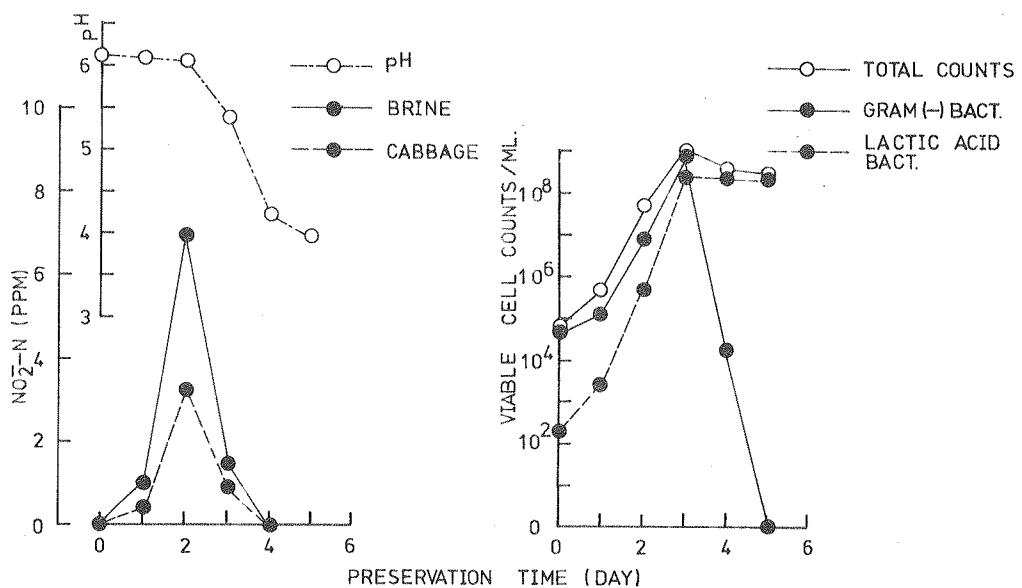


Fig.8 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the cabbage or brine during preservation at 20°C.

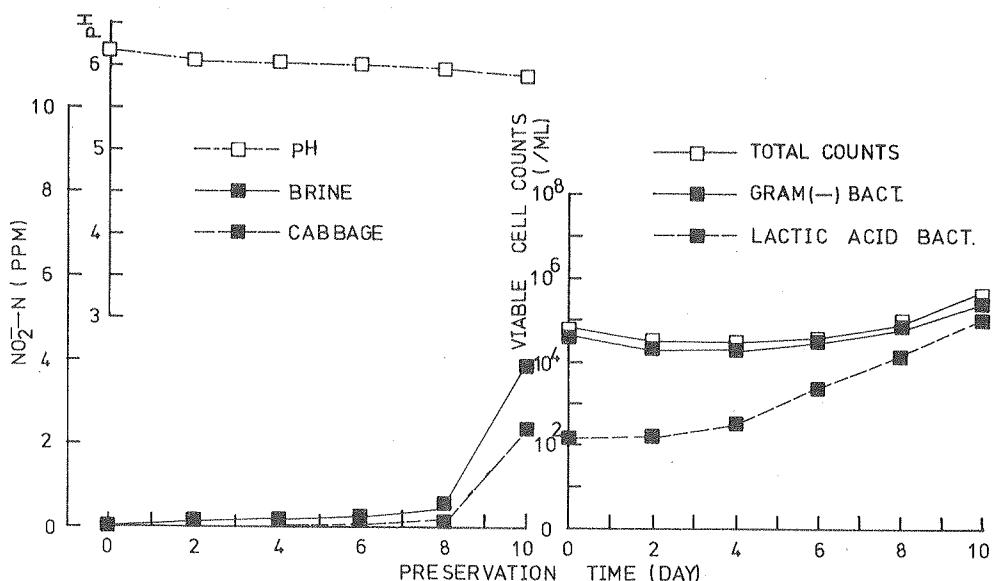


Fig.9 Changes of  $\text{NO}_2\text{-N}$ , pH and bacteria in the cabbage or brine during preservation at 5°C.

5℃保存の場合も20℃保存の場合と同様の傾向を示し、亜硝酸は10日目には漬け液で155ppm、コマツナそのもので100ppmに達した。

生菌数は10日目には $10^8/ml$ に達したが、pHは6.0前後の変動に終始し、グラム陰性菌は減少することもなく、緩やかに増加した。

キャベツの例については20℃保存の結果はFig.8に、5℃保存の結果はFig.9に示した。20℃に保存した場合は、保存開始後2日目で漬け液中の亜硝酸の生成は6.9ppmのピークに達したが、細菌の急速な増殖に伴い4日目にはpH4.20となり、亜硝酸は消滅した。

キャベツそのものの亜硝酸は、漬け液の場合と同様に2日目にピークに達したが、漬け液における含量よりも低く、3.2ppmであった。3日目で生菌数が $10^8/ml$ に達した後は、グラム陽性菌が主要菌となり、pHはさらに低下し、5日目にはpH3.95となり、グラム陰性菌は死滅した。

5℃保存の場合は、漬け液、キャベツそのものとともに亜硝酸の増加は少なく、10日目ではそれぞれ3.9、2.4ppmに達したに過ぎなかった。

生菌数は10日目に到っても、 $10^5/ml$ にとどまり、pHの低下も5.9とあまり変化はなく、グラム陰性菌も10日目には $10^5/ml$ となり、減少はみられなかった。

## 2. 微生物叢の変化

各浅漬けを20℃で保存した時の微生物叢の変化を調べる目的から、それぞれの浅漬け試料より経時的に、代表的な菌株を総計約700株分離し、整理した後、属あるいは菌群レベルでの同定を行ったが、その結果をキュウリ、ダイコンについてFig.10に、コマツナ、キャベツについてFig.11に示した。

キュウリの場合は0日目の微生物叢はCoryne form. bacteria, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, Enterobacteriaceae, *Micrococcus*, 酵母など多種類の微生物により構成されていたが、亜硝酸の生成がみられた1日目にはEnterobacteriaceaeや*Pseudomonas*などの硝酸還元能を有する菌群が主要菌叢となり、亜硝酸の減少が始まった2日目以降では乳酸菌が菌叢のほとんどを占めるようになった。

ダイコンの場合はキュウリの場合と同様、0日目の微生物叢はEnterobacteriaceae, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, 乳酸菌など多種類の微生物により構成されていたが、亜硝酸の生成がみられた1~2日目にはEnterobacteriaceaeや*Pseudomonas*などの硝酸

還元能を有する菌群が主要菌叢となり、亜硝酸の減少が始まった3日目以降では乳酸菌が菌叢のほとんどを占めるようになった。この傾向はダイコンの場合と同じであった。

コマツナの場合、0日目の微生物叢は先述のキュウリ、ダイコンの場合と同様、*Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Micrococcus*などにより構成されていた。しかし、それ以降は、キュウリ、ダイコンの場合には乳酸菌の増加により亜硝酸の減少、消滅がみられたが、コマツナの場合には、2~4日目に乳酸菌の出現が認められたが6日目には減少しており、Enterobacteriaceae, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*が主要菌叢であった。

キャベツの場合はキュウリ、ダイコンの場合と同様、0日目の微生物叢は*Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Flavobacterium*, *Micrococcus*など多種類の微生物により構成されていたが、亜硝酸の生成がみられた2日目にはEnterobacteriaceaeや*Pseudomonas*などの硝酸還元能を有する菌群が主要菌叢となり、亜硝酸の減少が始まった3日目以降では乳酸菌が菌叢のほとんどを占めるようになった。この傾向はダイコン、キュウリの場合と同じであった。

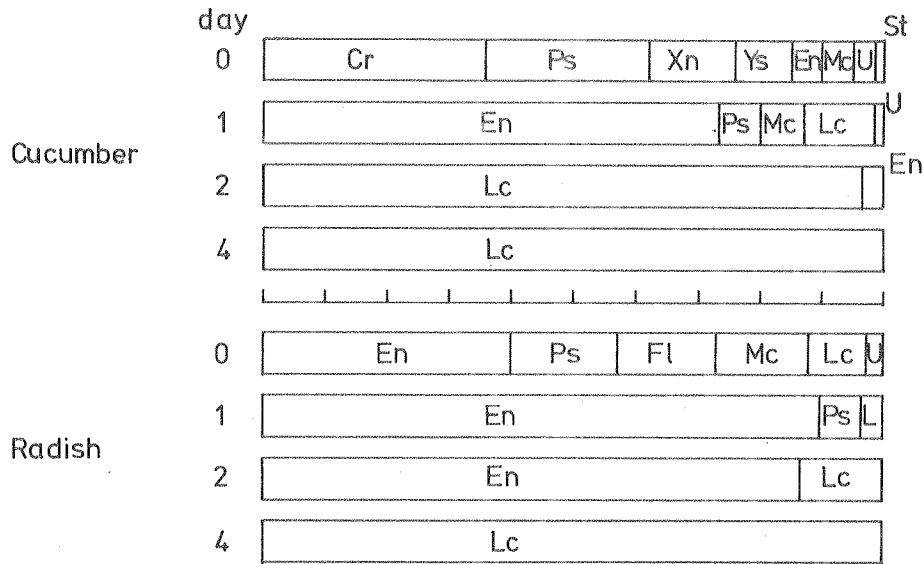
## 3. 各微生物群における硝酸還元菌の分布

各浅漬けより分離・同定した約700株の細菌についてそれぞれの硝酸還元能の有無について調べ、各微生物群における分布状況をまとめたのがTable 1である。

その結果、分離菌株全体の37.7%が硝酸還元能を有しており、グラム陽性菌のなかでは64.1%，グラム陰性菌のなかでは26.1%が硝酸還元能を有していた。硝酸還元能を持つ菌株の比率が高い菌群としては、グラム陽性菌では*Bacillus*(100%), *Staphylococcus*(100%) *Micrococcus*(94.1%), グラム陰性菌では多くはEnterobacteriaceae(89.2%)でつぎに*Pseudomonas*(16.7%)であった。*Acinetobacter-Moraxella*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*はいずれの分離菌株も硝酸還元能を有してはいなかった。

## 4. 主要分離菌株の同定

浅漬けから分離した硝酸還元能を有する菌株のうち比較的の出現頻度の高いものおよび特徴のある菌株9株についてそれらの形状、生化学的性状を調べ、まとめたものがTable 2である。その結果、硝酸還元菌のうち出現頻度が高かったEnterobacteriaceaeの多くがEnterobacterに属していることがわかった。その他のものは、*Micro-*

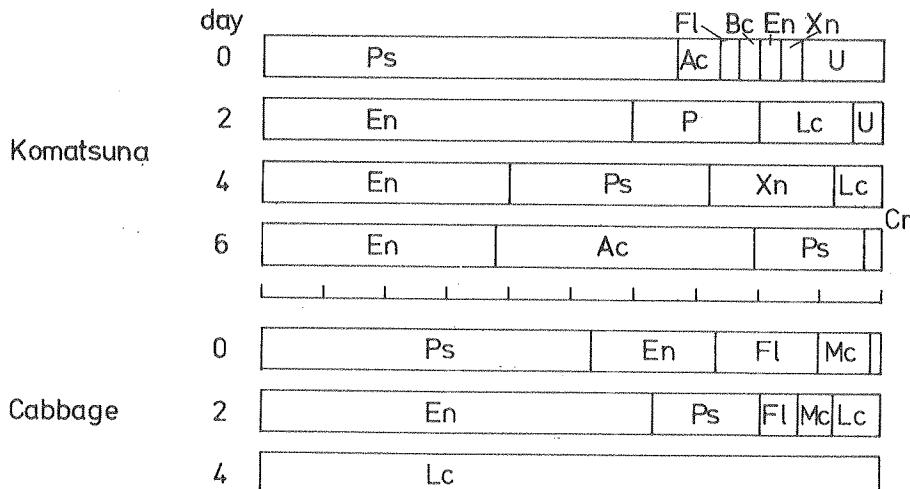


Cr: Coryneform bact. En: Enterobacteriaceae Fl: Flavobacterium

Lc: Lactic acid bacteria Mc: Micrococcus Ps: Pseudomonas

St: Staphylococcus Xn: Xanthomonas Ys: Yeasts U: Unknown

Fig.10. Changes in microflora of low salt Cucumber and Radish brines during Preservation at 20°C.



Ac: Acinetobacter-Moraxella. Bc: Bacillus. En: Enterobacteriaceae

Fl: Flavobacterium Ps: Pseudomonas Xn: Xanthomonas

Cr: Coryneform bact. Mc: Micrococcus Lc: Lactic acid bact.

U: Unknown

Fig.11. Changes in microflora of low salt Komatsuna and Cabbages brines during Preservation at 20°C.

Table 1 Distribution of Nitrate Reducing Bacteria in low salt vegetable brines.

Genera of Family	Number of bacteria	Number of Nitrate Reducing bacteria		Nitr. Reducing bacteria
		Reducing bacteria	Nit. Reducing bacteria	
Gram (-) bacteria	73	50	64.1%	28 35.9%
<i>Micrococcus</i>	34	32	94.1%	2 5.9%
Coryne-form bacteria	42	16	38.1%	26 61.9%
<i>Bacillus</i>	2	2	100%	0 0%
<i>Staphylococcus</i>	1	1	100%	0 0%
Gram (+) bacteria	272	71	26.1%	201 73.2%
<i>Pseudomonas</i>	96	16	16.7%	80 83.3%
Enterobacteriaceae	58	55	98.2%	1 1.8%
<i>Acinetobacter-Morazella</i>	55	0	0%	55 100%
<i>Flavobacterium</i>	49	0	0%	49 100%
<i>Xanthomonas</i>	16	0	0%	16 100%

*ococcus varians*, Coryneform bacteria, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Citrobacter freundii*, *Erwinia* sp. であった。

## 5. 分離した硝酸還元菌の *in vitro* における亜硝酸の生成

分離した代表的な硝酸還元菌の *in vitro* での硝酸還元について調べたものが Fig. 12 で 30.5°C で培養した場合における亜硝酸生成の経時的变化をみたものである。

30°C 培養の場合は、*Cit. freundii*, *Ent. aerogenes*, *Erwinia* など大腸菌群に属している細菌の亜硝酸生成量が高く、特に *Cit. freundii* は 2 日目には 800 ppm 以上に達した。

Table 2 Microbial characteristics of strains isolated from low salted vegetable brines.

Microbial characteristics	Strains								
	G P 1	G P 3	G P 5	C 7	C 24	E 1	E 2	E 6	E 7
Gram stain	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Shape	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Motility	-	-	*	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	+W	+	+	-	-	-	-
OF-Test	O	F	O	O	F	F	F	F	F
Spore	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pigment	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Fluorescent pigment	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Growth at 42°C	*	*	*	-	-	*	*	*	*
VP reaction	-	-	+	-	-	+	+	-	+W
IPA	*	*	*	*	*	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S production (TSI)	*	*	*	*	*	-	-	+	-
Citrate	+W	-	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Starch hydrolysis	-	-	+	-	-	-	-	-	*
Esculin hydrolysis	*	*	+	-	-	-	+	-	-
Lysine decarboxylase	*	*	*	*	*	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	*	*	*	*	*	+	+	-	-
Acid from carbohydrates									
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	*	*	*	*	*	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+W	+
Lactose	+	-	-	-	-	+	+	+W	+
Sucrose	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Notes. (+) ~ positive, (-) ~ negative, s ~ spheric, r ~ rod, w ~ weak, (-) ~ Not tested

Strains: GP 1 ~ *Micrococcus varians*      E 1 ~ *Enterobacter cloacae*

GP 3 ~ Coryne-form bacteria

GP 5 ~ *Bacillus* sp.

C 7 ~ *Pseudomonas* sp.

C 24 ~ *Pseudomonas* sp.

E 2 ~ *Enterobacter aerogenes*

E 6 ~ *Citrobacter freundii*

E 7 ~ *Erwinia* sp.

同じグラム陰性菌の *Ps. fluorescens* は 2 日目で約 50 ppm の生成がみられた。グラム陽性菌の *Mic. varians*, *Coryneform bacteria* の生成量はグラム陰性菌と比較すると全体的に低い傾向がみられた。

5°C 培養の場合は、30°C 培養の場合と異なり、低温性細菌の *Ps. fluorescens* や大腸菌群のなかでも比較的低温下での生育が良好な *Ent. aerogenes* の亜硝酸生成量が高

く *Cit. freundii* やグラム陽性菌の亜硝酸生成量は低い傾向がみられた。また、生成量も *Ent. aerogenes* の場合で 8 日目に 72 ppm と低い値にとどまっていた。

Fig. 13 は浅漬けから比較的多く分離された *Pseudomonas* のうち硝酸還元能を有する菌株の還元能力の差異について調べてみたものであるが、その結果、同じ *Pseudomonas* であっても各菌株間にかなり差のあることがわ

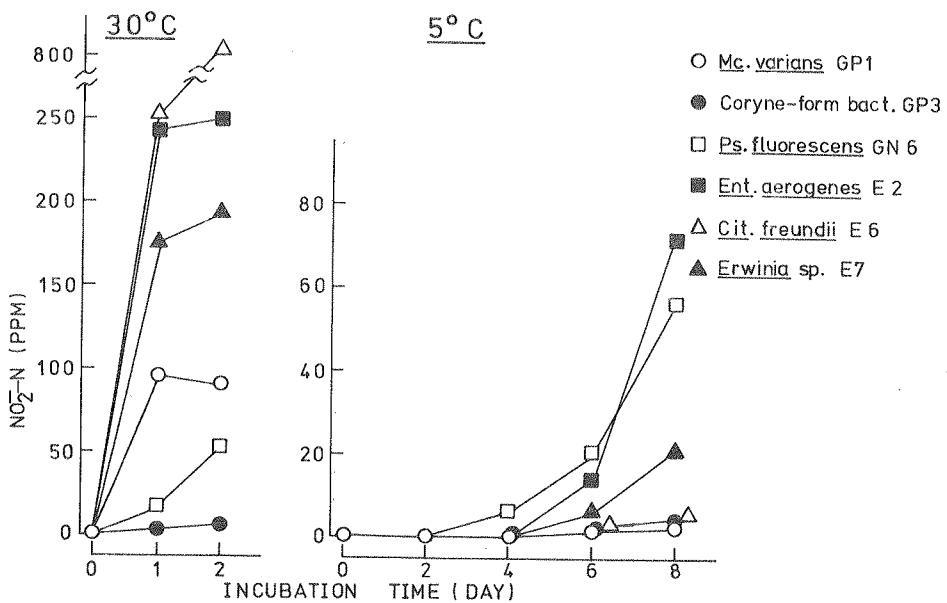


Fig.12. Effect of cultivation temperature on accumulation of  $\text{NO}_2^-$ .  
Cultivation medium was PYG (0.5% peptone 0.25% yeast ext. 0.02%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5% NaCl 1.0% glucose 1.0%  $\text{KNO}_3$  pH 6.8).

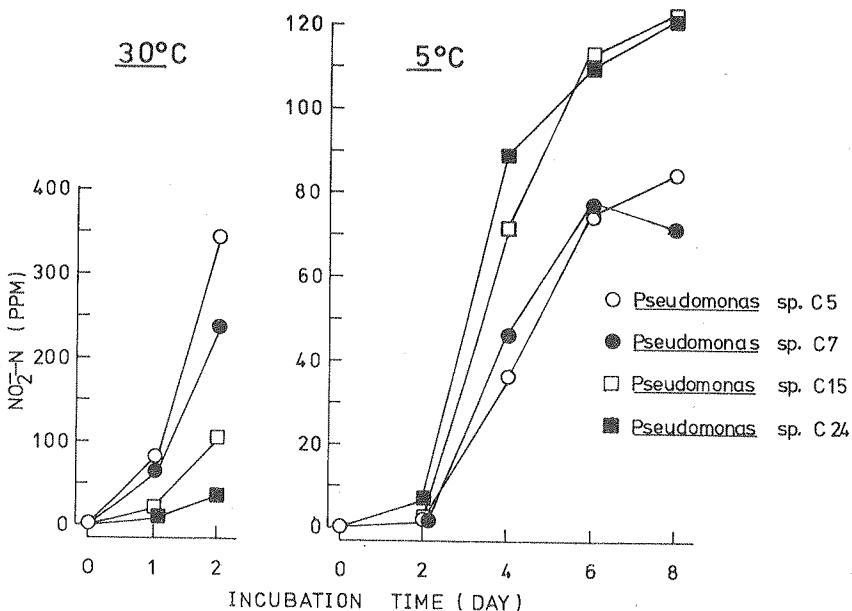


Fig.13. Effect of cultivation temperature on accumulation of  $\text{NO}_2^-$ .  
Cultivation medium was PYG (0.5% peptone 0.25% yeast ext. 0.02%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5% NaCl 1.0% glucose 1.0%  $\text{KNO}_3$  pH 6.8 ).

かった。また *Pseudomonas* sp. C5 は 30°C 培養においては他の菌株に較べて亜硝酸生成能は高かったが、20°C 培養においては逆に *Pseudomonas* sp. C15 や C24 の方が高くなるなど、培養温度によっても差が生じることがわかった。

#### 6. 各菌株の亜硝酸生成に及ぼす食塩および乳酸の影響

漬物には通常、食塩を用いるので分離菌株の亜硝酸生成に及ぼす食塩の影響について検討を加え、Fig.14 に示す結果を得た。

*Enterobacter* は *Ent. aerogenes*, *Ent. cloacae* とともに食塩 4% 下でも増殖および亜硝酸生成がみられたが、*Pseudomonas* sp. C7 は 4% 下でわずかながら増殖がみられたものの亜硝酸の生成はほとんど認められなかった。

つぎに漬物の保存中に生成され、pH 低下の要因となっている乳酸の影響について調べてみたものが Fig.15 である。いずれの菌株も培養液中の乳酸濃度の上昇に伴い、増殖および亜硝酸の生成量が低下した。*Enterobacter* の場合には、0.05% に

おいても増殖、亜硝酸の生成が認められたが、*Pseudomonas* の場合には、0.025% で増殖、亜硝酸の生成ともに認められなかつた。

#### 7. 分離菌株の亜硝酸生成速度に及ぼす食塩およびグルコースの影響

硝酸還元菌の亜硝酸生成速度に及ぼす食塩およびグルコースの影響について調べたがその結果を Fig.16 に示した。食塩の影響に関しては *Ent. aerogenes*, *Ent. cloacae* を対象に行ったが、0% の場合の亜硝酸生成速度を 100% とすると、食塩濃度が高まるに従い亜硝酸生成速度は低下し、*Ent. aerogenes* では食塩 1.0% で 30%，食塩 2.0% で 25% となり、*Ent. cloacae* では同様にそれぞれ 9.3, 6.8% となり著しい活性度の低下が認められた。

つぎにグルコースの影響に関しては前述の二株に加え、*Pseudomonas* sp. C7 を対象に行ったが、グルコースを添加しない場合にはいずれの菌株においてもほとんど亜硝酸の生成は認められなかつたが、グルコースを 0.2% 以上添加されている場合は通常の活性を示した。以上のことから、硝酸還元による亜硝酸の生成には漬物中のグルコースの存在が影響を及ぼしていることがわかった。

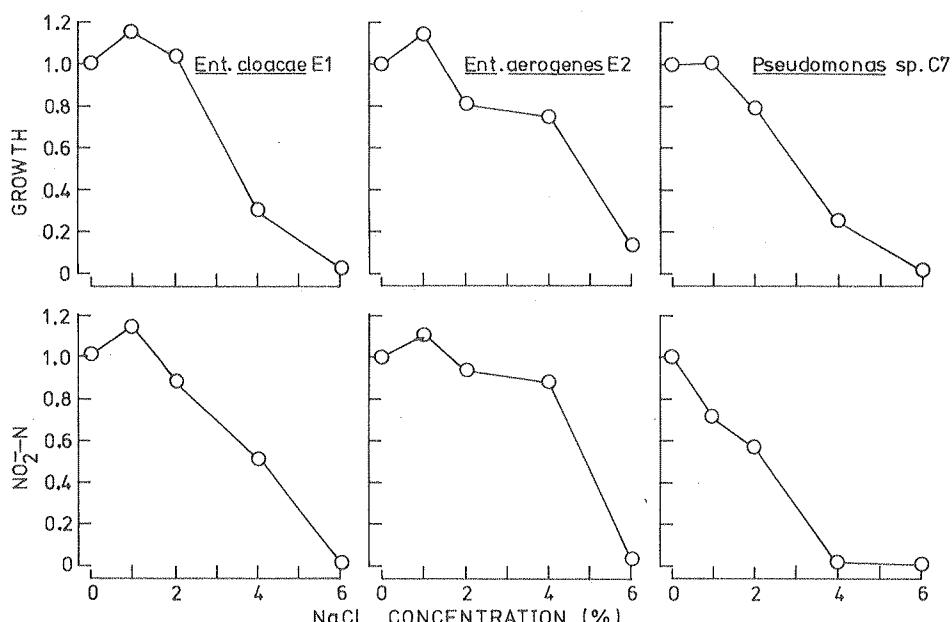


Fig.14. Effect of NaCl concentration on the growth and accumulation of  $\text{NO}_2^-$  by bacteria at 30°C.

Basal medium was 0.5% peptone, 0.25% yeast ext. 0.5% glucose pH 6.8.

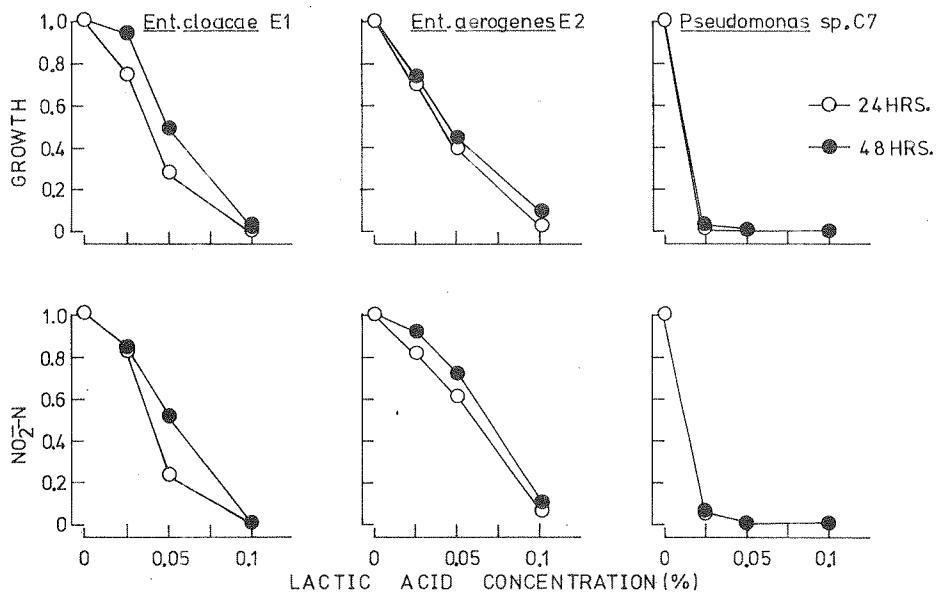


Fig. 15. Effect of Lactic acid concentration on the growth and accumulation of  $\text{NO}_2^-$  by bacteria at 30° C.

Basal medium was 0.5% peptone, 0.25% yeast ext., 0.5% NaCl, 0.5% glucose.

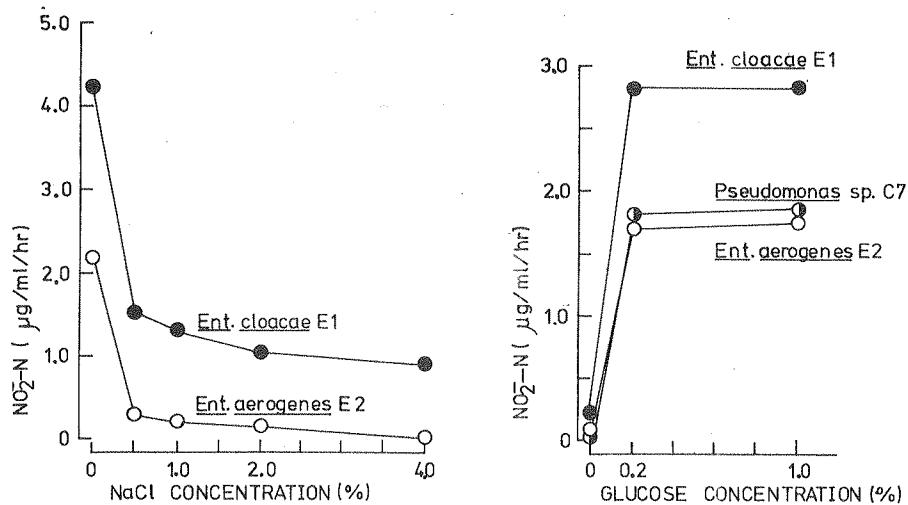


Fig. 16. Effect of NaCl or Glucose concentration on reductive activities of  $\text{NO}_3^-$  at 30° C. (Reduction by resting bacteria)

## IV. 考 察

### 1. 各種浅漬けにおける亜硝酸および微生物叢の変化

キュウリ、ダイコン、コマツナ、キャベツの浅漬けを調製し、20℃、5℃に保存した場合における亜硝酸、pH 微生物叢および微生物数の変化について検討を加えたところ、キュウリ、ダイコン、キャベツでは、20℃保存のピーク時における漬け液中の亜硝酸濃度はそれぞれ4, 68, 6.9 ppm と差異がみられたものの微生物の増加に伴う亜硝酸の生成がみられた後、pH が低下するにつれて亜硝酸が減少し、ついには消滅する傾向は同様であった。これは、微生物叢の変化をみても同傾向を示しており、保存初期には *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, 酵母など多種類の微生物により汚染されているが、保存経過に従い初期微生物叢のなかでは比較的食塩、pH に抵抗性があり増殖の速度が早い *Enterobacteriaceae* がだいぶ主要菌叢となった。そして乳酸菌が増加するにつれ、*Enterobacteriaceae* は pH の低下により減少、死滅するのが共通の傾向としてみられた。しかし、コマツナの場合は保存初期には *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Coryneform bacteria* が主要菌叢となり、pH の低下も認められなかった。亜硝酸の生成をみると、コマツナ以外の野菜においてはピーク時でもダイコンの場合で 68 ppm に過ぎなかったが、コマツナの場合には 20℃ 保存で、2 日目には 230 ppm に達しており亜硝酸が細菌の増殖を抑制する事実や<sup>31)</sup>畜肉 製品のボツリヌス対策に亜硝酸塩が使用されている事実<sup>32)</sup>を考慮すれば、硝酸還元菌の初期の旺盛な増殖による亜硝酸の蓄積が乳酸菌の増殖を抑制し、その結果 pH の低下が生じることなく、さらに硝酸還元菌などのいわゆる雑菌の増殖を助長したものと考えられる。pH 低下のもととなる乳酸菌の増殖および乳酸の生成には野菜中の糖含量、環境温度、溶存酸素量など多くの要因が考えられるが、初期の微生物叢や微生物量による影響が本試験の結果わかった。したがって亜硝酸が硝酸還元菌、乳酸菌

その他の微生物の増殖および乳酸の生成など微生物の代謝に及ぼす影響について今後検討する必要があると思われる。

### 2. 硝酸還元菌の分布および種類

浅漬けより分離した約 700 株の細菌についてそれぞれの硝酸還元能の有無について調べ、各微生物群における分布をみたところ、分離菌株全体の 34.7 % が硝酸還元能を有していたが、硝酸還元能を持つ菌株の比率が高い菌群は *Bacillus* (100%), *Staphylococcus* (100%), *Enterobacteriaceae* (98.2%), *Micrococcus* (94.1%) などでグラム陽性菌に比率の高いものが多くみられ、*Pseudomonas* (16.7%), *Acinetobacter - Moraxella*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* (0%) などのグラム陰性菌は低いもの多かった。しかし、浅漬け中では一般的にグラム陽性菌の増殖は遅いので、量的面を考慮すればグラム陰性の硝酸還元菌、特に *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* が浅漬けにおける亜硝酸生成に最も重要な役割を果たしているものと考えられる。

そこで *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* に注目し種の同定を行ったところ、*Pseudomonas* では *Ps. fluorescens* 類緑菌、*Enterobacteriaceae* では *Enterobacter aerogenes* 類緑菌が主要菌であることがわかった。

### 3. 硝酸還元菌の亜硝酸生成

分離した代表的な硝酸還元菌の亜硝酸生成の状況について培養温度、乳酸濃度などの点から検討を加えた結果、常温域(30℃)での培養は *Enterobacter*、低温域(5℃)では *Pseudomonas* による亜硝酸生成が他のものよりも多く、浅漬けを保存した時の亜硝酸生成には常温では主に *Enterobacter*, *Klebsiella* などの大腸菌群に属する細菌が、低温保存の場合には低温性細菌である *Pseudomonas* や大腸菌群の中でも比較的低温域での生育が良好な *Enterobacter* などが関与していることが推定される。

また、食塩、乳酸が亜硝酸の生成に及ぼす影響をみたところ、*Pseudomonas* はいずれにおいても *Enterobacter* よりも強く影響を受け増殖、亜硝酸の生成とともに低濃度で停止した。したがってこれらのこと考慮すれば、漬物において亜硝酸生成の主要菌となるものは初期には *Pseudomonas* や大腸菌群に属する細菌であるが乳酸菌の増殖に伴う乳酸濃度の上昇により次第に *Pseudomonas* の活動は停止し *Enterobacter* などの大腸菌群が主要菌になることが想像され、実際に浅漬けの微生物叢の変遷をみても同様な傾向がみられる。したがって今後は微生物叢の変遷と亜硝酸との関連についてさらに検討する必要があ

るものと考えられた。

## V. 要 約

キュウリ、ダイコン、キャベツおよびコマツナの浅漬けにおける亜硝酸の生成と各微生物群の挙動について検討を加え以下の知見を得た。

- 1) キュウリ、ダイコン、キャベツの浅漬けを20℃で保存したところ、ピーク時における亜硝酸濃度はそれぞれ4.68, 6.9 ppmと差異がみられたものの、硝酸還元菌の増殖とともに生成された亜硝酸が生成され、引き続いて乳酸菌の増殖によるpHの低下によって亜硝酸および初期の主要菌叢である *Pseudomonas*, 大腸菌群は減少、消滅するという傾向は同様であった。

- 2) 一方、コマツナの場合は2日目で亜硝酸濃度は230 ppmに達し、乳酸菌の増殖およびpHの低下もみられず、主要菌叢は大腸菌群、*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Coryneform bacteria*などとなり最終的には腐敗した。
- 3) 漬物中に生成される亜硝酸量が漬物の微生物叢の変遷、特に乳酸菌の増殖および生酸に大きな影響を及ぼしているものと考えられた。

- 4) 漬物から分離された硝酸還元菌はグラム陽性菌では *Bacillus*, *Micrococcus*, *Coryneform bacteria*, *Staphylococcus* でグラム陰性菌では *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* でなかでも *Pseudomonas*, *Enterobacter* が主要菌であった。

- 5) 主要な硝酸還元菌の同定を行ったところ、*Pseudomonas* では *Ps. fluorescens* 類縁菌、*Enterobacteriaceae* では *Ent. aerogenes* 類縁菌であった。

- 6) 主要な硝酸還元菌の亜硝酸の生成に及ぼす温度、食塩、乳酸の影響をみたところ、中温域では *Enterobacter*, 低温域では *Pseudomonas* の方が亜硝酸の生成が多く、*Pseudomonas* は *Enterobacter* よりも食塩、乳酸の影響を強く受ける傾向がみられた。

## VI. 引用文献

- 1) 慶田雅洋、津郷友吉：食衛誌、10, 59(1969)
- 2) 酒井綾子、谷村顕雄：食衛誌、12, 170 (1971)
- 3) 小田嶋成和：食衛誌、15, 419 (1978)
- 4) 谷村顕雄：衛生化学、22, 245 (1976)
- 5) Tannebaum, S. R., Sinkey, A. J., Weisman, M., Bishop, W. : J. National Cancer Inst., 53, 79 (1974)
- 6) 村松経一、丸山節子、西沢第二：食衛誌：20, 106 (1979)
- 7) 丸山節子、村松経一、清水重徳、牧 幸男：食衛誌、17, 19 (1976)
- 8) 小西康夫、柄倉恒栄、緒方浩一：醸工、45, 795 (1967)
- 9) 小西康夫、柄倉恒栄、緒方浩一：醸工、45, 803 (1967)
- 10) 小西康夫、柄倉恒栄、緒方浩一：醸工、45, 809 (1967)
- 11) Konishi, Y. : J. Ferment. Technol., 47, 759 (1969)
- 12) 小西康夫、米津英司：醸工、45, 447 (1971)
- 13) 村上：醸協誌、50, 108 (1956)
- 14) Wright, M. J. and Davison, K. L. : Advances in Agronomy, 16, 197 (1967)
- 15) 篠崎謙一：畜産の研究、21, 295 (1975)
- 16) 中村 豊、吉田條二、中村亮八郎、堀江博文：日畜会報、47, 63 (1976)
- 17) Hall, C. B. and Hicks, J. R. : J. Food Sci, 42, 549 (1977)
- 18) 畑 明美、緒方邦安：栄養と食糧、22, 58 (1969)
- 19) 畑 明美、緒方邦安：栄養と食糧、24, 345 (1971)
- 20) 畑 明美、緒方邦安：栄養と食糧、24, 485 (1971)
- 21) 畑 明美、南出隆久、緒方邦安：食品工誌、20, 421 (1973)
- 22) 畑 明美、緒方邦安：食品工誌、23, 132 (1976)
- 23) 畑 明美、緒方邦安：食品工誌、23, 257 (1976)
- 24) 畑 明美、緒方邦安：食品工誌、25, 280 (1976)
- 25) 松井久夫：農化、16, 1167 (1940)
- 26) 柳原紀子、藪田 快、米山 平、山田正一：食衛誌、4, 343 (1963)
- 27) Norman, R. S. and Roger, A. Y. : Am. J. Vet. Res., 34, 133 (1973)
- 28) 祐川金次郎、松本多計治：栄養と食糧、28, 389 (1975)
- 29) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed., (Williams & Wilkins Co.), (1974)
- 30) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 2nd Ed. ( Cambridge Univ. Press )
- 31) Nurmi, E. V. and Turnnen, S. O. : 16 th European Meeting of Meat Research Workers. 1, 413

- 32) Tompkin, R. G. Christiansen, L. N. and Shaparis, A. R. : Appl. Environ. Microbiol. 35, 59 (1978)
- 33) Tompkin, R. B., Christiansen, L. N. and Shaparis, A. B. : Appl. Environ. Microbiol. 37, 351 (1979)
- 34) Robach, M. C. : Appl. Environ. Microbiol. 38, 846 (1979)