温和加熱が発酵漬物由来細菌の生育に およぼす影響

宮 尾 茂 雄*・小 川 敏 男**

Effect of Moderate Heat on the Growth of Bacteria Related to the Fermented Pickles

Shigeo MIYAO* and Toshio OGAWA**

* Tokyo Metropolitan Agricultural Experiment Station,
3-8-1, Fujimi-cho, Tachikawa-shi, Tokyo 190

** Ogawa Pickles Laboratory, 1-13-8, Asahigaoka,
Hino-shi, Tokyo 191

This paper was undertaken to investigate the reason for the immersing of vegetables to hot water for a short time before fermentation in case of manufacturing fermented pickles. When the vegetables were treated with moderate heat at 50°C, Gram negatives were destructed more rapidly than Gram positives. *Pseudomonas fluorescens* was particularly destructed to 10^{-2} after heat treatment at 45°C for 15 minutes. From the leakage of 260 nm absorbing substances, orsinol reactive materials and carbohydrates from heated cells of Gram negatives, it was suggested that the damage to the cell membrane and degradation of ribonucleic acid took place within the moderate heat (45°C) treated cells. The viable cells of Gram negatives which were able to reproduce on modified plate count agar medium containing sodium chloride by moderate heat treatment were decreased with increasing concentration of sodium chloride. These results suggested that the salt tolerance of them were lowered by heat treatment. Since Gram negatives containing nitrite producing bacteria contaminating vegetables were easily destructed by moderate heating, nitrite production was depressed at an early stage of fermentation.

(Received Nov. 10, 1989)

著者らは既報¹⁾で、過度の亜硝酸の生成によってカブの発酵漬物が正常に発酵しない例を見だし、その理由は亜硝酸生成菌の異常な増殖にもとづくことを明らかにした。さらに亜硝酸が漬物由来細菌におよぼす影響²⁾、漬物成分と硝酸還元酵素の活性との関係³⁾について検討を行った。

長野県木曽御岳山麓で作られている「すんき漬」は食塩をまったく使わない無塩の発酵漬物として知られており⁴⁾、原料野菜の王滝カブラを湯に一定時間浸漬した後漬け込み、乳酸発酵を行なわせるのが特徴である。同様に中国北京地方で作られている無塩漬物の酸菜⁵⁾も湯に

浸漬した後、発酵させて作る。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軟らかくし漬け込みやすくする効果のほかに、乳酸発酵を正常に進行させるために亜硝酸生成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る効果も考えられる。

HURST ら⁶⁾は *Staphylococcus aureus* が 52°C 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、土戸ら^{7,8)}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

* 東京都農業試験場 (〒190 東京都立川市富士見町 3-8-1)

** 小川漬物研究所 (〒191 東京都日野市旭が丘 1-13-8)

感受性が増大することを報告している。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ありうるものと考えられる。

そこで著者らは、原料野菜の温和加熱処理が付着細菌および発酵におよぼす影響について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株は、漬物原料野菜および発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, *Streptococcus faecalis* ML-8, *Streptococcus faecium* ML-12, *Pediococcus pentosaceus* ML-4, *Lactobacillus plantarum* L-4) で発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, /蒸留水 1l, pH 6.4) を用い行なった。

2. 生菌数測定

一般的に生菌数を測定する際はプレートカウント寒天 (栄研) を用い、常法により混釈培養法で行なった。選択計数が必要な場合は、グラム陽性細菌は 0.25% フェニルエチルアルコール加プレートカウント寒天、グラム陰性細菌は CVT 寒天 (日水) を用い、塗抹法により 30°C, 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プレートカウント寒天を用いて計数し、対照のものと比較した。

3. 菌体外漏洩物質の測定

温和加熱処理 (45~55°C) 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 0.1 mg/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分離管に採取し、3000 rpm, 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⁹⁾、フェノール硫酸法⁹⁾ による全糖の測定を行なった。

4. 亜硝酸の定量

調製したカブの発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既報¹⁾ 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。

実験結果および考察

1. 野菜付着菌の死滅におよ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°C) を行なった場合の残存菌数の変化を調べたものが Fig. 1 である。グラム陽性細菌は加熱 30 分経過後において、45°C ではほとんど死滅せず、50°C では約 10^{-1} に、55°C では 10^{-4} に菌数が減少した。しかし、10 分間の加熱では 50°C ではほとんど変化がなく、55°C 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°C の加熱でも徐々に死滅し、30 分経過後は約 10^{-1} に減少した。50°C ではさらに死滅は促進され、20 分後で約 10^{-2} , 30 分後では約 10^{-3} まで減少した。また、55°C では 10 分間の加熱では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考えられる。

2. 漬物由来細菌の死滅におよぼす温和加熱の影響

野菜付着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になったので、つぎに漬物由来細菌の死滅に対する温和加

Fig. 1 Effects of various heating temperatures on the viability of bacteria on turnips

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

● : Gram positives, ■ : Gram negatives

熱処理の影響について調べた結果を Table 1 に示した。

45℃, 15 分間の加熱では *Ps. fluorescens* が 10^{-2} 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 10^{-2} から 10^{-3} に減少したが, グラム陽性細菌は 10^{-1} に減少したにとどまった。

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 2 に示した。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 の分解がおこな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見られず, 45℃ の場合とあまり変わりがなかった。*Flavobacterium* sp., *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* は 45℃ の

Table 1 Thermal death of various bacteria after moderate heat treatment

Strain		Viable cell counts (cfu/ml)		
		Control(unheated)	45℃	50℃
<i>Pseudomonas 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>Enterobacter aerogenes</i>	E-2	6.2×10^5	6.0×10^5	5.1×10^3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E-8	5.4×10^5	5.4×10^5	2.0×10^2
<i>Micrococcus varians</i>	M-4	1.2×10^5	1.2×10^5	1.1×10^4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	L-11	8.1×10^5	8.0×10^5	5.4×10^3
<i>Streptococcus faecalis</i>	ML-8	5.8×10^5	5.6×10^5	8.4×10^4
<i>Streptococcus faecium</i>	ML-12	5.3×10^5	5.3×10^5	7.2×10^4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ML-4	5.0×10^5	5.1×10^5	6.5×10^4
<i>Lactobacillus 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.

Table 2 Leakage of 260 nm absorbing materials, orcinol reactive materials and carbohydrate from heated cells

Strain		260nm absorbing materials(O.D.)		Orcinol reaction positive materials(as RNA μ g/ml)		Carbohydrate (as glucose μ g/ml)	
		45℃	50℃	45℃	50℃	45℃	50℃
<i>Pseudomonas 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>Enterobacter aerogenes</i>	E-2	0.27	0.42	2.8	5.9	6.5	14.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E-8	0.41	0.41	3.1	3.4	3.2	6.2
<i>Micrococcus varians</i>	M-4	0.04	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	L-11	0.02	0.02	0.0	0.0	3.4	3.4
<i>Streptococcus faecalis</i>	ML-8	0.03	0.03	0.0	0.0	3.0	2.2
<i>Streptococcus faecium</i>	ML-12	0.04	0.04	0.0	0.0	3.5	3.4
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ML-4	0.05	0.07	0.0	0.0	5.0	6.2
<i>Lactobacillus 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.

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および 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 260 nm 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°C で短時間の加熱処理では細胞膜に対してあま

Fig. 2 Leakage of 260nm absorbing materials and orcinol reactive materials from heated suspension cells of various Gram negative bacteria in phosphate buffer (pH 6.8) at 50°C

○: 260 nm 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. 3 Leakage of 260 nm absorbing materials and orcinol reactive materials from heated suspension cells of various lactic acid bacteria in phosphate buffer (pH 6.8) at 50°C

○: 260 nm absorbing materials

●: orcinol reaction positive materials (as RNA)

A: *Leuconostoc mesenteroides* L-11, B: *Streptococcus faecalis* ML-8

C: *Pediococcus pentosaceus* ML-4, D: *Lactobacillus plantarum* L-4

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. 2 に、乳酸菌については Fig. 3 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。

4. 温和加熱処理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処理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. 4 である。

Fig. 4 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

M. luteus および *L. plantarum* は 45℃ で 30 分処理しても 4% 食塩加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り、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、*E. aerogenes* および *K. pneumoniae* の場合は 30 分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見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、*K. pneumoniae* は 4% 食塩加培地において 30 分の加熱処理でコロニーの形成は 10^{-3} 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発酵初期における微生物および亜硝酸濃度の変化

温和加熱処理 (50℃, 20 分間) が実際の漬物の発酵におよぼす影響を知る目的から試験を行ない、その発酵初期における細菌数および亜硝酸濃度の変化について調べたものが Fig. 5 である。対照はグラム陰性細菌が多く 1 日目で 10^8 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、グラム陰性細菌は 10^5 から 10^2 、グラム陽性細菌は 10^4 から 10^3 に低下し、温和加熱処理がグラ

Fig. 5 Changes of bacteria and nitrite of pickling turnips treated with mild heating (50°C) during fermentation at 20°C

○: Gram positives, control

●: Gram positives, heated

□: Gram negatives, control

■: Gram negatives, heated

△: nitrite, control

▲: nitrite, heated

ム陰性細菌の減少に効果的であることを示した。つぎに生菌数の変化を見ると初発菌数の低下にともない生菌数および亜硝酸の増加は遅延し、生菌数が 10^8 近くまで増加したのは 3 日目となり、亜硝酸の生成量は $5 \mu\text{g/ml}$ 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、同時にその後の発酵において亜硝酸の生成量が少なくなることがわかった。

要 約

発酵漬物の製造の際に原料野菜を湯に一定時間浸漬した後、乳酸発酵を行なわせる場合がある。そこで、その意義を知る目的から、発酵漬物から分離した細菌を対象に、温和加熱処理が細菌の死滅、細胞内成分の漏洩および漬物の発酵における亜硝酸の蓄積におよぼす影響について調べ、次の結果を得た。

(1) 原料野菜を 50°C 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見られた。

(2) 発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* が特に熱感受性が高く、 45°C 、15 分の加熱処理で 10^{-2} に減少した。

(3) グラム陰性細菌は 45°C 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 の分解がおこっていることが推定された。しかし、グラム陽性細菌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、その後の発酵において亜硝酸の蓄積量は少なかった。

文 献

- 1) 宮尾茂雄・小川敏男：日食工誌，投稿中。
- 2) 宮尾茂雄・小川敏男：日食工誌，投稿中。
- 3) 宮尾茂雄・小川敏男：日食工誌，投稿中。
- 4) 宮尾茂雄： *New Food Industry*, 26, 61 (1984)。
- 5) 小川敏男：漬物製造学（光琳，東京），（1989）。
- 6) HURST, A., HUGHES, A., COLLINS-THOMPSON, D.L. and SHAH, B.G.: *Can. J. Microbiol.*, 20, 1153 (1974)。
- 7) 土戸哲明・中川良勝・岡崎光雄・芝崎 勲：発酵工学, 50, 93 (1972)。
- 8) 土戸哲明・岡崎光雄・芝崎 勲：発酵工学, 50, 341 (1972)。
- 9) 阿南功一・紺野邦夫・田村善蔵・松橋通生・松本重一郎：基礎生化学実験法，5 巻（丸善，東京），（1976）。

（平成元年 11 月 10 日受理）