- 2) E. Leifson : J. Bact. **21**, 331 (1931).
- 3) C. Eijkman : Arch. Neerland Physiol. **2**, 616 (1918).
- 4) M. Amaha, Z. J. Ordal : J. Bact. **74**, 596(1957).
- 5) N. Grelet : Ann. Inst. Pasteur **82**, 66 (1952).
- 6) 品川哲也 : 阪市大医誌. **9**, 4047 (1960).
- 7) J. A. Mc Carthy, W. E. Cassidy : J. New Engl. Water Works Assoc. **57**, 287 (1943).
- 8) M. T. Hyatt, H. S. Levinson : J. Bact. **77**, 487 (1959).
- 9) 堂本康彦ら : 広島食品工試. **6**, 73 (1961).
- 10) 金礪純子 : New Food Ind., **1**, No. 8, 26(1959).
- 11) 勝井次男, 梅田真男 : ibid. **3**, No. 2, 1(1961).
- 12) 幸保文治 : 日大医. **20**, 1411 (1961).
- 13) 小沢樹夫, 長岡達, 新垣正次 : 食衛誌. **4**, 287 (1963).

各種そ菜汁液中の硝酸塩含量について

(昭和 38 年 9 月 5 日 受 理)

柳 原 紀 子* 菰 田 快*
米 山 平* 山 田 正 一*

Nitrate Content in Juice of Various Vegetables

Toshiko YANAGIHARA, Hayashi KOMODA,
Hitoshi YONEYAMA, and Masakazu YAMADA
(Department of Fermentation, Tokyo University of Agriculture :
Setagaya-4, Setagaya-ku, Tokyo)

Some Japanese salted greens often contain large quantities of nitrous acid which have already been proved to be derived from nitrate in vegetable juice by some bacteria.

We quantitatively estimated nitrate content (as N_2O_5) in various vegetables by the diphenylamine sulfuric acid reagent and by the xyleneol method.

The results are as follows:

The figures are N_2O_5 mg in 1,000 ml of pressed juice.

Celery 1,025, spinach 830, roots of radish 612, burdock 580, leaves of Welsh onion 450, shepherd's purse 430, chinese cabbage 350, lettuce 302, white mush melon 295, carrot 255, leaves of radish 260, asparagus 230, beafsteak plant 217, egg apple 212, cucumber 175, cabbage 160, onion 160, tomato 150 and scallion 145.

When such vegetables are salted in summer, nitrite reaches its maximum amount in 24~29 hours and then disappears entirely after 3~4 days, while in winter reaching its maximum one in 72 hours and then decreases gradually.

(Received September 5, 1963)

かつて、松井、菅原、山田¹⁾は、そ菜を塩漬にしたとき汁中に亜硝酸が現われ、その多いものでは100万分中35~40 mg に達すると報じ、この現象は漬物中の細菌が硝酸を還元して亜硝酸とするためであるとした。

* 東京農業大学醸造学科：

東京都世田谷区世田谷 4 丁目

ところで漬物原料中の硝酸が多いほど、多量の亜硝酸が生成されと考えられるが、一般にそ菜等に含まれる硝酸がどれほどのものであるかについて、これまでに実験例は見られない。

本実験では各種漬物原料の硝酸量を定量し、代表的なものを実際に漬物として、原料そ菜中の硝酸がどのよう

に変化していくかについて観察した。またそれらに関連する微生物についても考察した。

その結果、そ菜、果物中、硝酸含量の大きいものはセロリ、ホウレン草、一般の根菜類で、葉菜はこれに次ぎ、茎菜や果物は小さい。

新鮮な漬物原料中には亜硝酸は含まないが、汁をしぼって放置すると、数時間で亜硝酸が多量に検出されるようになる。

市販漬物中、硝酸は相当検出されるが亜硝酸は日時が経っているためか、ほとんど検出されなかった。

塩漬では、夏期は24～29時間ですでに亜硝酸が最大量となり、3～4日間で不検出となるのに対し、冬期は72時間で最高量となり、のち次第に減少する。

漬物中の微生物消長は、はじめ二連球菌が現われ亜硝酸生成が始まり、次いで長桿菌が勢力を得て酸生産が増して亜硝酸は消失し、最後に野生酵母の生殖を見る。この点、清酒用育てとの縮図のような有様を示すのはすこぶる興味が深い（学生のモデル実習に好適）等のことが知られた。

実験

I 測定法

1. 硝酸定性法

ジフェニルアミン法²⁾ 硫酸ジフェニルアミン溶液10滴に検体を滴加すると、硝酸または硝酸塩が存在するとき青らん色を呈する。

2. 硝酸定量法

xylenol 法 (A.O.A.C.—暫定法)³⁾

試料40 ml を50 ml のメスフラスコに入れ、ブロムクレゾールグリーン指示薬3滴を加えて硫酸(1:10)を滴加し液が黄色を呈したら滴加をやめる。これを振りながら $\frac{1}{5}$ N 過マンガン酸カリウムを滴加し、亜硝酸を硝酸塩に酸化し液が15～20秒間微紅色を保つに至り、硫酸(1:10)1 ml およびリンタングステン酸(20%)1 ml を加え、標線まで水を加えろ過する。

上記ろ液より、硝酸性窒素 0.05～0.15 mg を含むように検液(20 ml 以下)をとり、500 ml の三角フラスコに入れこれにアンモニア銀液(硝酸を含有しない硫酸銀5 g をアンモニア水60 ml に溶解し煮沸して約30 ml に濃縮し、冷却後希釈して100 ml とする)1～2 ml を加えて、塩素イオンおよびリンタングステン酸の過剰を沈殿させ、3倍容の硫酸(3:1)を加え約35°に冷却後 *m*-xylenol (1-hydroxy 2,4-dimethyl benzene, Eastman 製品 No.1150, またはこれに相当するもの) 0.05 ml を加えセンを施して振とうし、30分間 30～40°に保持する。ニトロ化が終了後、注意してセンを洗いながら水150 ml を加え蒸留し(蒸留球を装した普通の蒸留装置で冷却器は West type のものを用いる)、水酸化ナトリウム溶液(1% 水酸化ナトリウム試液)5 ml を入れた受器に留液40～50 ml が得られたら、これを100

ml のメスフラスコに移し標線まで水を加え、硝酸性窒素 0.003～0.006 mg を含む一列の標準色と比色する。

標準色列は前記の方法により、標準硝酸塩(再結晶した硝酸カリウム 0.1804 g を水に溶解し1 L とする。この液10 ml は硝酸性窒素 0.25 mg を含む)を使用してニトロ化を行ない、蒸留後留液を100 ml として、比色法により標準硝酸性窒素の検量線を作成し、試料中の硝酸性窒素量を測定する。

第1図 硝酸性窒素検量線(日立 EPO-B 430 m μ , 30 mm Cell)

3. 亜硝酸定性法

ヨー化亜鉛デンブ法²⁾ 20 ml の検体に1～2滴の硫酸を加え、ヨー化亜鉛デンブ液を滴加すると青らん色を呈する。

4. 亜硝酸定量法

sulfamide-naphthyl ethylene diamine 法, 変法⁶⁾

亜硝酸に sulfamide を作用させて、後者のジアゾ化を起こさせ、これに *N*-(1-naphthyl)ethylene diamine をカップリングさせて生ずるアゾ色素を比色定量する。

操作法 タンパク質を含む試料の際はその5 ml に、冷飽和酢酸ウラニル2～3 ml を加え、遠沈した上澄液を使用する。試料中の NO₂ 量は12 μ g/ml 以下でなければならない。

タンパク質を含まない試料1 ml に1:1希塩酸(比重1.19の濃塩酸使用)1.2 ml, 0.2% スルファミン液1 ml を加えて3分間放置する。つぎに0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylene diamine 2·HCl を0.2 ml 加え、これに水7.6 ml を加えて全量を10 ml とする。2分以上経過後比色定量を行なう(発色は2分以上90分まで安定)。試料を水として試薬対照を同時に作り比色の標準とする。

検量線は亜硝酸標準液(特級亜硝酸ナトリウムを120°, 2時間乾燥後30 mg を溶解して1 L とする。この液は NO₂ 20 μ g/ml を含む)を使用し、2～10 μ g/ml の範囲内で作成する。これより試料の亜硝酸量を求め希釈倍数をかける。

第2図 亜硝酸検量線 (日立 EPO-B
530 m μ , 10 mm Cell)

5. 酸の定量

混合指示薬を用い、試料 10 ml 中の 0.1 N-NaOH の
滴定数を酸度とした。

6. pH

pH メーターによる。

7. 試料の処理法

そ菜一定量を野菜ジュースにかけ、得られた汁を色
素を有するものは活性炭で脱色後、分析に供した。

8. 硝酸還元微生物の観察は以下の方法による。

A. 形態観察：顕微鏡による。

B. 硝酸還元能試験：硝酸塩添加寒天培地（肉エキス
10 g, ペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, 硝酸カリウ
ム 1 g, 水 1 L 寒天 2.5%）に、漬物汁 1 滴を加えて平
面培養を行ない、発生したコロニー上から Griess 寒天
試薬を注ぎ、赤色反応の現われるコロニーを釣取し分離
した。

II 実験結果

1. 各種漬物原料およびそ菜中の硝酸、亜硝酸量

第1表

野 菜 名	ジフェニ ルアミン 反 応	硝酸性 窒素量 (mg/ 10ml)	亜硝酸量 (μ g/ 10ml)	10 ³ , 4日放 置後(汁) の亜硝酸 量(μ g/ 10ml)
アスパラガス	±	2.300	不検出	
ウド			〃	787.5
インゲン	±	2.625	〃	195.0
カブ	±		〃	0
キャベツ	—	1.600	〃	0
キュウリ	—	1.750	〃	249.0
ゴボウ	±	5.800	〃	
サントウナ	±		〃	127.0
サラダ菜			〃	82.0
サヤエンドウ	—			

サクラの葉	—		不検出	
シロウリ	±	2.950	〃	
シソの葉	±	2.175	〃	
ショウガ	—			
セロリ	—			
セロリ	卅	10.250	不検出	1350.0
ダイコン・根	±	6.125	〃	0
ダイコン・葉	±	2.600	〃	0
タマネギ	—	1.600		0
トマト	—	1.500		0
ナス	±	2.125	痕 跡	1125.0
ナズナ	+	4.300	不検出	
ニラ	±		〃	0
ニンジン	±	2.850	〃	0
ニンジン・葉			〃	157.5
ネギ・茎	±	2.975	〃	0
ネギ・葉	+	4.500	〃	0
ハクサイ	+	3.500	〃	490.5
ビーマン	—	1.575	〃	97
ビート・葉	+			
ビート・根	±			
ハウレン草	±	8.300		
ラッキョウ	—	1.450		
レタス	±	3.025		

第2表 市販漬物中の硝酸および亜硝酸量

品 名	硝酸性 窒素量 (mg/ 10ml)	亜硝酸量 (μ g/ 10ml)	酸 度 (ml)	pH
ナス みそ漬	0.425	不検出	9.0	
ダイコン かす漬	3.700	〃	13.5	
ナス めか漬	1.825	〃	12.5	
タクアン ㊶	3.550	〃	2.9	
タクアン ㊷	2.150	痕 跡	3.0	4.5
シロウリ めか漬	7.400	〃	2.4	
ナス 塩 漬	1.475	〃	3.9	3.4
タカナ 漬	3.275	不検出	7.1	3.5

2. 塩漬中の硝酸、亜硝酸の消長

A. キュウリ 1.5 本, キャベツ ¼ 個, セロリ 1 本, 総
重量 584 g. 食塩濃度 2%. 夏期室温で試験を行なう(第
3表).

B. キュウリ 1.5 本, キャベツ ¼ 個, 青シソ 3 枚, 総
重量 405 g. 食塩濃度 2%, 夏期室温で試験を行なう(第
4表).

C. ハクサイ 2.25 kg, 食塩濃度 1.5%, 冬期室温で試
験を行なう. とともに亜硝酸および酸の消長をおもに観察
した(第5表).

第 3 表

経過時間	硝酸性窒素量 (mg/10ml)	亜硝酸量 (μg/10ml)	酸度	pH	備 考
24	4.063	64.0			
29		41.0			
48	4.063	52.0	1.6		
53		40.0			
〃 汁	3.813	17.0			
72		33.0	1.9		
77		30.0	2.3		
96	4.500	9.5	3.6	4.1	長桿菌が圧倒的多数、球菌は少ない酵母(だ円形)も存在
101		2.0			
〃 汁	4.560	不検出	3.3	4.2	表面上の膜は多数の産膜酵母でしめられる
120		不検出			

第 4 表

経過時間	硝酸性窒素量 (mg/10ml)	亜硝酸量 (μg/10ml)	酸 度	pH
24	1.375	不検出		
29		44.3		
48	1.675	21.3	4.2	
53		47.3		
〃 汁	1.625	5.3	4.7	
72	1.425	7.3	5.0	
77		2.3	5.3	
〃 汁	1.800	痕 跡	4.8	
96	1.575	不検出	5.8	3.92
〃 汁	1.600	〃	5.4	4.0

注) 第 3, 4 表の汁というのは漬物をしぼった汁のこと。

第 5 表

日 順	亜硝酸量 (μg/10ml)	酸 度	アミノ酸 (ホルモル法)	pH	備 考
1	2.792	不検出		5.8	
2	5.648	〃		6.1	
3	29.312	0.6		5.6	
4	20.256	0.7		4.9	
5	4.896	1.7		4.6	
6	5.648	2.5		4.8	
7	4.896	3.2	2.7	4.6	二連球菌が多く長桿菌わずかに存在。酵母はみられない。
8	2.026	4.0	3.6	4.4	
9					
10	痕 跡	5.1	3.6	4.6	同 上

3 種の塩漬にみられたおもな酵母と細菌の形と大きさ。

① 酵母, 大きさ, $3.7\mu \times 9.8\mu$ (最少 2.5μ × 最大 12.7μ)

形

② 細菌

長桿菌 大きさ, $17.7\mu \times 1.27\mu$ (最大 30.4μ × 最少 7.3μ)

形

球菌 大きさ, $1.27\mu \times 1.27\mu$

形

3. 硝酸還元微生物の観察

A. 形態観察: 記載省略。

B. Griess 寒天試薬を注ぎ, 赤色反応を示したコロニーより分離した菌 5 種を, 硝酸塩添加液体培地に移し 30° で観察した。

第 6 表

菌 種	48時間後 NO ₂ 量 (μg/10ml)	72時間後 NO ₂ 量 (μg/10ml)	菌の発育状態
産膜性酵母 ①	4.4	4.4	膜を形成, 多量に沈殿を生ずる
〃 ②	不検出	不検出	〃
〃 ③	〃	〃	膜形成, 沈殿有り
バクテリア ①	119.0	192.5	発育不良, わずかに沈殿有り
バクテリア ②	516.3	490.0	〃

結論および考察

1. 漬物原料中の硝酸量: そ菜, 果菜, 根菜, 茎菜, 樹木の葉, 豆類等の種類別により硝酸量の差が見られる。大根, カブ, ゴボウ, ビート等の根菜には多量の硝酸が検出された。茎菜のタマネギ, ネギ, ラッキョウ, ショウガ, アスパラガスではほとんど検出されないか, またわずかに認められる程度である。果菜である, トマト, ナス, ビーマン, キュウリ, シロウリ, インゲン, サヤエンドウ等は, ほとんど検出されない。葉菜類のホウレン草, レタス, ヨモギ, ハクサイ, ダイコンの葉,

シソの葉、サントウ菜、キャベツ等は標準量の硝酸を含み2.0~2.5 mg/10 ml が検出された。セロリが最高量を示したのは注目に値する。

2. 漬物原料中の亜硝酸量：新鮮な漬物原料にはほとんど亜硝酸は含まれていないが、汁をしぼったものを数時間放置すると、非常に多量の亜硝酸を生成する。これは古くなったそ菜も同様である。

3. 市販漬物中の硝酸および亜硝酸：市販漬物8種中いずれも硝酸の存在を認めたが、亜硝酸は一点が痕跡検出されたのみで他はほとんど検出しなかった。これは製造後、日時をかなり経ているので、酸量が多いため亜硝酸が分解され、揮散消失したものと思われる。

4. 漬物中硝酸、亜硝酸の消長：夏期2種の漬物を経時的に分析した結果、漬込後24~29時間で亜硝酸は最高に達し、以後次第に減少して3~4日目には不検出となる。また冬期塩漬の亜硝酸は72時間で最高を示し、以後次第に減少した。一方これらの亜硝酸が硝酸より還元されたと考えると、硝酸量は次第に減少するはずであるが、本実験では、ほとんど変化はみられなかった。

5. 漬物中微生物の消長：漬込後1日目には2連球菌がさかんに増殖し、ついで長桿菌が現われはじめ、3~4日目頃より球菌にかわって圧倒的多数を示すようになった。この現象は亜硝酸の生成消滅とも関連して、清酒の酒母の乳酸菌消長と類似した点が見られ興味深い。また酵母類は亜硝酸の存在のためか、少数の産膜性野性酵母の存在が認められる程度であった。

7. 分離した微生物のうち、亜硝酸生成能の顕著なものは2種のバクテリアであり、酵母類には亜硝酸生成能はほとんどみられなかった。

文 献

- 1) 松井久夫：農化。16, 1167 (1940)；松井久夫，大沢美弘，山田正一：醸協。46 (9), 543~47 (1951)；松井久夫，山田正一，菅原雅：醸協。51, 536 (1956)。
- 2) 山田正一：“醸造分析法”。
- 3) 大岡増二郎：“食品分析”一般試験法 p. 36。
- 4) 光電比色法各論 3，化学の領域増刊37。