

[醸工 第43巻, 第3号, p. 157~164, 1965]

食塩を使わない漬物「スンキ」の乳酸菌群について

(第1報) 菌の分離および桿菌群の同定

中山 大樹・小池 弘子

(山梨大学工学部発酵生産学科)

Taxonomic Studies on the Lactic Acid Bacteria
Isolated from "Sunke", a Local Saltless Pickle

(I) Isolation of Bacteria and Identification of Rods

Ooki Nakayama and Hiroko Koike

(Department of Food Technology, Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu)

In the Kiso district of Nagano prefecture, there is a local pickle called *sunke*, a native vegetable food, prepared without brine or vinegar. The author isolated 25 strains of lactic acid bacteria from 15 specimens of *sunke* and five specimens of various pickles, obtained from the same district. In this paper 19 strains of isolated rods were identified as follows:—

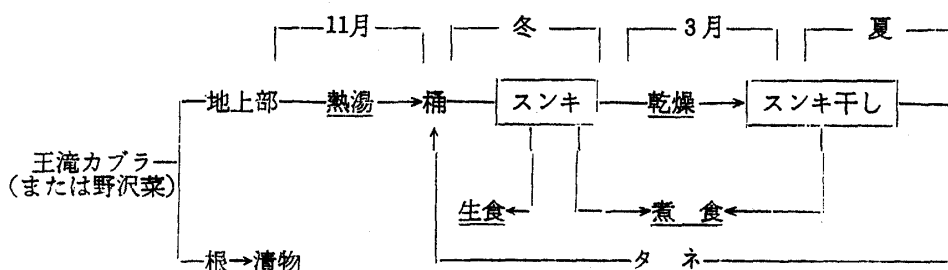
One strain of spore bearing rod isolated from dried *sunke* was identified as *B. coagulans* Hammer. Six strains of homo-fermentative rods were identified as *L. plantarum* (Orla-Jensen) Holland, one strain of hetero fermentative rods was identified as *L. buchneri* (Henneberg) Bergey et al, and 10 strains of hetero-fermentative rods *L. brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al.

Among these strains two strains can be considered as new varieties, for which the authors proposed the names of *L. plantarum* (Orla-Jensen) Holland var. *sunkorum* nov. var. and *L. brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al. var. *otakiensis* nov. var. respectively.

緒 言

王滝村を中心とする長野県の本曾谷 (Fig. 1 参照) に「スンキ」という漬物が伝わっている。その詳細は別報¹⁾で紹介したが、製法などの大要は次のとおりである。

食塩を使わない点、原料を加熱する点および、特にタネを加える点が、ふつうの漬物と非常に異なっている。



筆者²⁾は、かつてスンキ干しの一片から *Leuconostoc mesenteroides* を分離し、また窪田ら³⁾はスンキの主菌は酢酸菌らしいといっているが、いずれも多数の試料を扱ったわけではなく、スンキの菌についての総合的な研究は、まだ行なわれていない。

スンキは芭蕉一門の匂⁴⁾にあらわれているところからも歴史が古いことが想像され、産地が孤立しており、製法、原料ともに特異なので、菌学的に検討する価値があるものと思われる。そこで多数の試料から菌を分離した結果、スンキの菌相についての概括的な知見および乳酸菌の新変種を得たので報告する。

なお、食塩を使わない漬物が腐らない原因、その応用などについては別報⁵⁾で論じた。

実験方法

1. 試料

1962年12月および翌年3月、スンキ、スンキ干しおよび対照として木曾谷産の動植物の漬物類を入手し、別々にポリエチレン袋に密封して持ち帰り、直ちに菌の分離を行った。試料番号および内容を Table 1 に示す。

試料No.13の正油豆は、水気の少ない正油の鹽に似たもの、No.14の小鳥ウルカは小鳥の内臓の塩辛である。スンキの汁は、いずれもpH 3~4の間にあり、静置すると多量の白色菌体が沈降する。菌体は、運動性のない桿菌、球菌または、その双方から成り、酵母、糸状菌、有孢子大型桿菌などは、顕微鏡下では一例も検出されなかった。

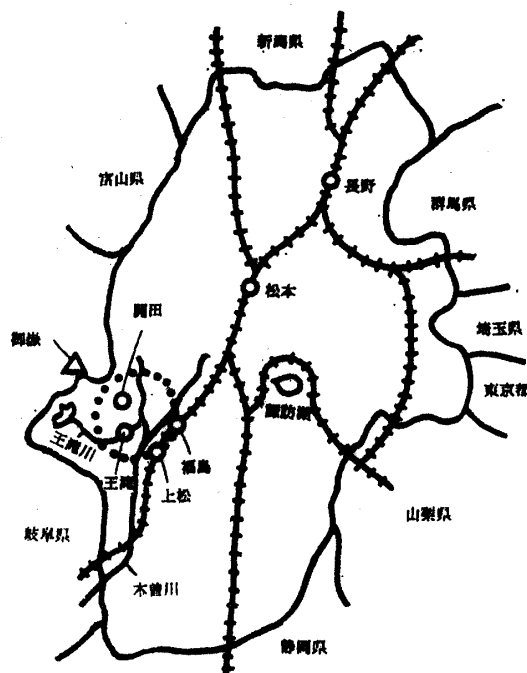


Fig. 1. 長野県略図 点線内がスンキ製造地帯

Table 1. Materials for isolation of bacteria.

No.	Materials	Produced from	Produced at	Date
1	<i>Sunki</i> (Saltless Pickles)	Leaves of <i>Ōtaki</i> -turnip	Fukushima-chō	Dec. '62
2~6, 8	"	"	<i>Ōtaki</i> -mura	"
7	"	Leaves of Nozawana	"	"
9, 10	Dried <i>sunki</i>	Leaves of <i>Ōtaki</i> -turnip	"	"
11, 12, 15	<i>Nukamisozuke</i> *	Roots of <i>Ōtaki</i> -turnip	"	"
13	<i>Shoyumame</i> *	Roasted soybeans	"	"
14	<i>Kotori-uruka</i> *	Entrails of birds	Fukushima-chō	"
16~18	<i>Sunki</i>	Leaves of <i>Ōtaki</i> -turnip	<i>Ōtaki</i> -mura	Mar. '63
19, 20	Dried <i>sunki</i>	"	"	"

* A kind of salted pickles

2. 菌の分離

20種類の試料の各々につき、室温(2~15°C)および30°Cで、直接法、加熱法および集菌法を試みた。得られた菌は麹汁、麹汁寒天および酵母エキス・ペプトン寒天に接種して30°Cで培養し、肉眼および顕微鏡下で観察した。その結果、同一試料から異なった方法または異なった培養温度で得られた菌が同一のものらしく思われたと

きは、直接法30°Cで分離した株のみを残し、他はリストから除外した。

a) 直接法

約1gの試料片に約5mlの麴汁を加えて振り混ぜ、その1滴を用いて、沈降炭酸石灰を加えた麴汁寒天で3段希釈平面培養を行なった。

b) 加熱法

上記の試料を浸漬した麴汁約1mlずつを小型試験管に取り、2分間沸騰湯煎したのち、そのまま集殖培養し、液のpHが低下したもののだけ、上記に準じ平面培養した。

c) 集殖法

上記a), b)の残りを、麴汁に試料片が入ったまま集殖培養し、上記に準じ平面培養した。

3. 分離菌の同定

一般的な試験にはアメリカ細菌学会の方法⁶⁾、生成物試験には片桐らの方法⁷⁾を準用した。ガス発生試験には、沈澱した菌体から出るガスを残らず捕集するように設計した改良型アインホルン管 (Fig. 2) を用い、孢子形成試験には酵母エキス寒天斜面を用いた。

耐塩試験および適温試験は、Bllg. 7°の麴汁5mlに菌を接種して30°Cで培養し、7日後にN/10 NaOHで滴定して生酸量を比較した。

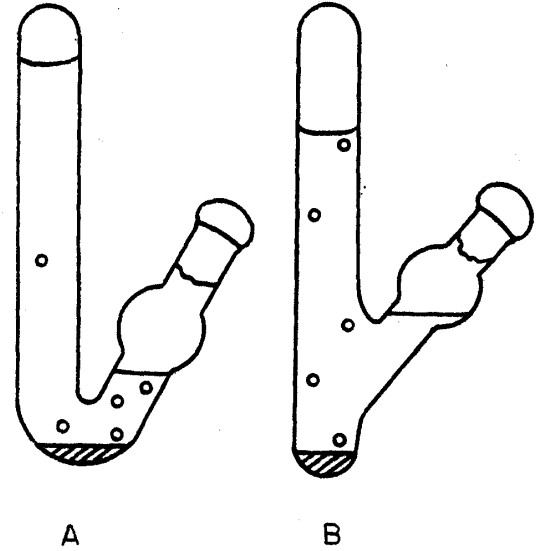


Fig. 2. Ordinary Einhorn (A) and improved (B) fermentation tube.

実験結果

1. 菌の分離

室温で分離されたものは、すべて30°Cでより早く生育し、形態的にも30°Cで分離されたものと同じらしく思われたので、リストから除外した。

加熱法で得られた有孢子乳酸菌1株は、直接法によって得られたものと同じらしく思われたので、リストから除外した。

30°C直接法で得られた菌は、試料番号をそのまま菌番号とし、集殖法で得られた菌は直接法によるものと同じと思われるものを除き、試料番号にLをつけて菌株番号とした。

Table 2. Types and numbers of lactic acid bacteria isolated.

Group	No. Isolated	Strain no.	Source
Spore bearing rod	1	20	Dried <i>sunki</i>
Homofermentative rods	6	2, 5, 16, 17-L	<i>Sunki</i>
		10	Dried <i>sunki</i>
Heterofermentative rods	11	14	<i>Kotori uruka</i>
		1, 2-L, 3, 6, 7, 8, 16-L, 18-L	<i>Sunki</i>
		9	Dried <i>sunki</i>
		13	<i>Shoyumame</i>
Tetracocci	5	15	<i>Nukamisozuke</i>
		1-L, 3-L, 17	<i>Sunki</i>
		12	<i>Nukamisozuke</i>
Homofermentative streptococci	1	19-L	Dried <i>sunki</i>
Hetero " "	1	4	<i>Sunki</i>
		11	<i>Nukamisozuke</i>

なお、いずれの場合も平板上には乳酸菌の集落がほとんど純粋培養に近い形であらわれたので、それ以外の集落はコンタミナントとみなし、リストに入れなかった。以上のようにして得られた26株の乳酸菌を、形態およびブドウ糖に対する発酵型式によって Table 2 のように大別した。

2. 有孢子乳酸菌の同定

寒天表面によく生育し、集落は小円形、白色バター状、液体培養は一樣に混濁し、のちに沈澱を生ずるが菌膜を作らない。

栄養細胞は $2\sim 3 \times 0.8\sim 1\mu$ 、円端で単在または短連鎖し、グラム陽性、抗酸性なく、莖膜もない。少数の周毛があり、運動性がある。ブドウ糖 0.3%以下の酵母エキス寒天上で孢子を作る。孢子は $1.5 \times 0.9\mu$ 、長円形で端在する。

適温は $40\sim 50^\circ\text{C}$ 、 60°C にも生育するが、 65°C では生育しない。通性好気性。好塩性なく、硫化水素、インドール、ガス、色素生産性は、いずれも陰性。ゼラチン、澱粉およびカゼイン液化性は、いずれも微弱。カタラーゼ強陽性、硝酸還元性あり、リトマス牛乳を赤変凝固する。

麹汁の pH を 4.2 に下げ、炭酸石灰で中和すれば、消費糖(ブドウ糖)の92%を右旋性(L)乳酸に、0.2%を酢酸に変える。

アラビノーズ、キシロース、果糖、ブドウ糖、麦芽糖、乳糖、マニトールから強く、ガラクトース、ショ糖、ラフィノーズ、トレハロース、糊精、グリセロール、 α メチルグルコシドから弱く生酸し、ラムノース、澱粉、イヌリン、ソルビットから生酸しない。

以上の結果から、No.20株は *Lactobacillus thermophilus* Ayes et Johnson, *L.sporogenes* Horowitz-Wlassowa and Nowotelnow, *Bacillus dextralacticus* Peterson and Johnson, *B. thermoacidurans* Werkman and Anderson または *B. coagulans* Hammer として報告されている好気性有孢子乳酸菌¹⁾と近縁のものと考えられる。

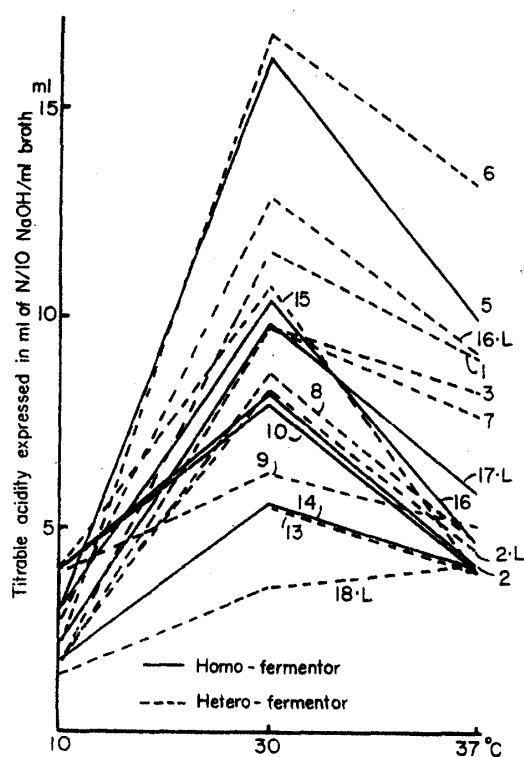


Fig. 3. Variation in titrable acidities of homo(—)and hetero(---) lactic acid fermentors with incubation temperature.

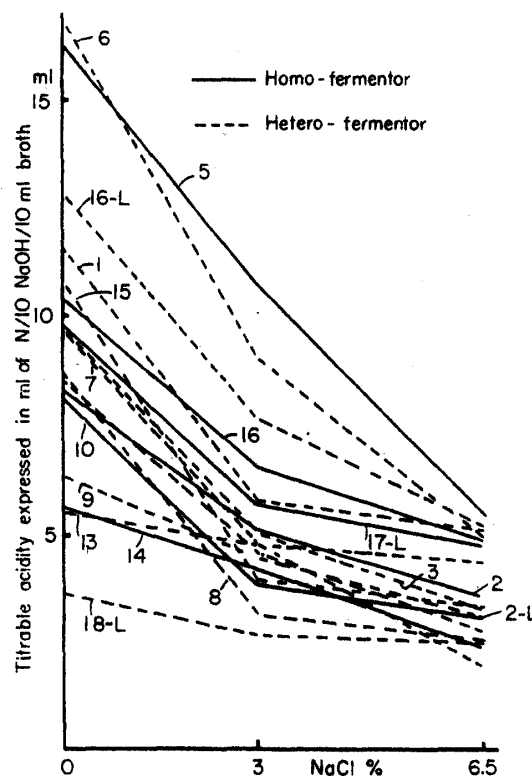


Fig. 4. Variation in titrable acidities of homo(—) and hetero(---) lactic acid fermentors with sodium chloride concentration.

3. 無孢子桿菌群の共通性質

寒天表面の生育は不良, 穿刺孔に沿ってよく生育する。集落は白色針頭状。液体培養は, はじめ一様に混濁し, 後に沈澱を生ずるが菌膜を作らない。無糖肉汁にはほとんど生育しない。グラム染色陽性で, 抗酸性なく, 莢膜なく, 運動性もない。

いずれも好塩性なく (Fig. 4 参照), 通性嫌気性で, 硫化水素・インドール・色素生産性, 硝酸還元性, ゼラチン・澱粉水解, 牛乳凝固, ショ糖粘化性, カタラーゼ反応は, いずれも陰性。ブドウ糖, ガラクトースおよび果糖から強く生酸する。No.18-L株をのぞき, 適温は30°Cである。(Fig. 3 参照)

以上の点から, いずれも *Lactobacillus* Beijerinck に属すべきものと思われる。

4. ホモ発酵型乳酸桿菌の同定

No.10株は1.5~2×1μの短桿菌, 他は2~3×0.7~1μの桿菌で, いずれも円端, 単在または短連鎖し, 横に相寄って筏状に見えることもある。培養が古くなると, 糸状, 球状, 勾玉状, 棍棒状などの異常形態をあらわすことが多い。

ブドウ糖からガスを発生せず, 麹汁のpHを4.0以下に下げ, 炭酸石灰で緩衝すると, 消費したブドウ糖の90%以上を光学的不活性乳酸に変える。揮発酸の生成は痕跡的。

糖類発酵性は Table 3 のとおりである。

Table 3. Fermentability of homo-fermentative rods.

Strain No.	Titrable ^{a)} acidity ml/10ml	Acid from ^{b)}																
		A	X	Gt	F	Sc	Ml	L	Rf	T	Rm	D	St	I	Sb	Mn	Gl	αM
2	8.3	+	⊕	+	+	+	+	+	⊖	+	±	-	-	±	⊖	⊖	+	±
5	16.3	+	⊕	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	+	+	+	+	-
10	8.0	⊖	⊕	+	+	+	±	±	⊖	+	+	±	-	-	⊖	⊖	+	-
14	5.6	±	-	±	+	+	⊖	+	⊖	±	-	-	-	⊖	⊖	+	-	
16	10.4	±	⊕	+	+	±	+	⊖	⊖	+	-	±	-	-	±	+	±	-
17-L	9.8	±	⊕	+	±	+	+	⊖	⊖	-	-	±	-	-	+	⊖	-	±

^{a)} 10 ml of glucose broth was titrated with N/10 NaOH

^{b)} +: Acid moderate, ±: scanty, -: none

⊕, ⊖: Different from standard description

of *L. plantarum* (Orla-Jensen) Holland

A: arabinose, X: xylose, Gt: galactose

F: fructose, Sc: sucrose, Ml: maltose, L: lactose, Rf: raffinose, T: trehalose, Rm:

rhamnose, D: dextrine, St: soluble starch, I: inuline, Sb: sorbitol, Mn: mannitol,

Gl: glycerol, αM: α-methylglucoside.

いずれもホモ発酵性の乳酸桿菌で好熱性なく, 牛乳に作用せず, ある程度ペントース発酵能があり, ラセミ乳酸を作るので, *L. plantarum* 型と考えられが, Table 3 の○印のところ, 典型的な *L. plantarum* と異なっている。中でもNo.10株はアラビノーズを発酵しないので *L. plantarum* (= *L. arabinosus*) の中に留めることは困難であり, 分離菌株数は少ないが, 新変種とするのが妥当であると考え, *L. plantarum* var. *sunkorum* nov. var. と命名することを提唱する。

Description of *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Holland var. *sunkorum* nov. var.

Rods, 1.0 by 1.5 microns, occurring singly or in short chains, with rounded ends. Under adverse conditions tend to be longer. Non motile. Gram positive.

Gelatin stab: No liquefaction. Agar slant: Growth, very faint. Broth: Turbid, clearing after a few days. Litmus milk: Unchanged.

Acid produced from xylose, glucose, fructose, galactose, sucrose, trehalose, rhamnose, glycerol, and lesser extent from maltose, lactose and dextrin. Arabinose, raffinose, starch, inulin, sorbitol and α -methylglucoside not fermented.

Lactic acid produced, optically inactive. Nitrites not produced from nitrates. Catalase negative.

Temperature relations: Optimum 30°C, growth poor below 15°C and above 37°C, maximum 38°C.

Source: Isolated from dried *sunki*, a native saltless pickles in Japan.

Deviation from the original description of *L. plantarum*: No acid from arabinose.

5. ヘテロ発酵型乳酸桿菌の同定

2~4×0.7~1 μ の桿菌で、いずれも円端、単在または短連鎖する。ブドウ糖から炭酸ガスを発生し、消費糖の40~50%をラセミ乳酸に変える。発酵性糖類は Table 4 のとおりであり、No.18-L 株のみは、やゝ好熱的である。

Table 4. Fermentability of hetero-fermentative rods.

Strain No.	Titrable* acidity ml/10ml	Acid from*																
		A	X	Gt	F	Sc	Ml	L	Rf	T	Rm	D	St	I	Sb	Mn	Gl	α M
1	11.6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	±
2-L	8.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	+	±
3	9.7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	±	-	-	±	+	±
6	16.8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	+	+	-	+
7	9.6	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	+	+	-	+
8	8.7	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	±	±	-	-	-	+	±
9	6.3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	±	-	-	+	+	+	+
13	5.6	+	+	±	±	±	+	-	±	+	-	±	-	-	-	±	±	+
15	10.8	±	+	±	+	±	+	-	-	+	-	±	-	±	-	-	-	-
16-L	12.9	+	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	±	+
18-L	3.6	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

* *Foot-notes, the same as the preceding table.

Bergey's Manual⁹⁾では、ヘテロ乳酸桿菌は好熱型と非好熱型に大別され、非好熱型は3種に分けられている。非好熱型のうち、*L. pastorianus*は長桿菌であることを特徴とするが、スunkiなどの菌は、いずれもこれに該当しない。*L. buchneri*はやゝ好熱的であり、No.18-L株以外はこれに該当しない。

No.18-L株をのぞけば、いずれも形態および適温の点で、残る*L. brevis*に一致する。ペントーズ発酵性が、*L. brevis*の大きい特徴であるが、No.8株をのぞけば、この点もよく一致する。Bergey's Manualは、keyの上でのみ、*L. brevis*にラフィノーズ、ショ糖および乳糖に対する非発酵性が強調されている。しかし、種の記載では*L. brevis*はこれらを発酵してよいことになっており、北原¹⁰⁾も、これらの発酵性を許している。したがって、やゝ好熱的なNo.-18L株およびペントーズを発酵しないNo.8株を除けば*L. brevii* (Orla-Jensen) Bergey et al.に入れてよからう。

No.8株はペントーズを発酵しないので、発酵性の点からは*L. fermenti* Beijerinck または、北原の分類表¹⁰⁾の*L. betadelbrückii* (Leichmann) Beijerinckに近いが、好熱性がまったく無いので、類縁関係は遠いと考えら

れ、むしろ *L. brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al. var. *otakiensis* nov. var. とすることを提唱する。

No.18-L 株は、やゝ好熱的な点は *L. fermenti* Beijerinck に近いが、ペントーズを発酵するので、*L. brevis* との中間種である *L. buchneri* (Henneberg) Bergey et al. ⁹⁾ とするのが妥当であると思われる。

Description of *Lactobacillus brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al. var. *otakiensis* nov. var.

Rods, 0.7 to 1.0 by 2.0 to 4.0 microns, with rounded ends, occurring singly, in short chains and occasionally in filaments. Non motile. Gram positive.

Gelatin stab: No liquefaction. Agar slant: Growth, faint. Broth: Turbid, clearing after a few days. Litmus milk: Unchanged.

Acid from glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinose, glycerol and α -methylglucoside, slightly acid from dextrin and starch, does not ferment arabinose, xylose, trehalose, rhamnose, inulin, sorbitol and mannitol.

Lactic acid produced optically inactive; acetic acid, ethyl alcohol and carbon dioxide formed in fermentation of glucose.

Nitrites not produced from nitrates, catalase negative.

Temperature relations: Optimum 30°C. Growth poor below 15°C and above 37°C. Maximum 40°C.

Source: Isolated from *sunki*, a native saltless pickles in Japan.

Deviation from the original description of *L. brevis*: No acid from arabinose and xylose.

考 察

木曾のスンキは孤立した環境の中で数百年以上にわたって存続して来た発酵産物なので、特定の特異な乳酸菌が主菌叢をなしているのではないかと想像されたが、今回の実験により、スンキの主菌叢は、適温の点でも、耐塩性の点でも、それほど特異なものではないことがわかった。

しかも、スンキにはきわめて広い領域の乳酸菌が関与しており、常温型乳酸菌の宝庫であることがわかった。今回分離された乳酸桿菌は同一種の中でも、糖類発酵性が同じものは一組もなく、乳酸の旋光性、適温などの本質的な点はそのまゝで、ペントーズ発酵能を失ったと思われる株さえ得られた。分離の時期を変え、あるいは多数の試料を扱えば、さらに多様な乳酸菌が得られる可能性がある。

要 約

長野県木曾地方特産の、食塩を使わない漬物「スンキ」および同地方産の動・植物原料の漬物類合計20点から菌を分離し、特にその中の桿菌群について同定し、次の知見を得た。

- 1) スンキの菌叢はほとんど乳酸菌のみから成っている。
- 2) 分離された菌は、次の25株である。 *B. coagulans* Hammer 1株, *L. plantarum* (Orla Jensen) Holland 6株, *L. buchneri* (Henneberg) Bergey et al. 1株, *L. brevis* (Orla-Jensen) Bergey et al. 10株, 四連球菌5株, 連鎖球状菌2株。
- 3) 分離された乳酸桿菌類は、いずれも糖類発酵性の上で標準株の記載と一致しない点があるが、中でも No. 10 および No. 8 の2株はアラビノーズ発酵性を欠いているので新変種と認め、それぞれ *L. plantarum* var. *sunkorum* nov. var. および *L. brevis* var. *otakiensis* nov. var. とすることを提唱した。

本研究の費用の一部は文部省科学研究費によるものであることを附記し、総合研究代表者北原覚雄教授、種々御指導を賜った本学発酵化学研究施設長小原巖教授、試料入手について多大のお世話を頂いた小瀬村大滝村長、大場技師はじめ木曾谷の皆様へ感謝する。

文 献

- 1) 中山: *Japan Food Science*, 3, 53 (1964).

- 2) 中山: 農化, **23**, 497 (1951).
- 3) 窪田, 松田, 久保田: 長野県衛生研, **11** (1957).
- 4) 日本古典全集 芭蕉全集後篇153 (1928).
- 5) 中山, 大場: 缶詰時報, **42**, 36 (1963).
- 6) Committee on Bacteriological Techniques of the Society of American Bacteriologists: *Manual of Method for Pure Culture Study of Bacteria*. Biotech. Publ. Geneva, N. Y.(1916)
- 7) 片桐, 北原: 農化, **10**, 942 (1934).
- 8) 中山, 小池: 山梨大醸酵研, **9**, 9 (1962).
- 9) Breed, R. S. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., 550 (1957).
- 10) 北原: 農化, **16**, 819 (1940).
(昭39. 11. 27受付)