

リンゴ浸漬液より分離した発酵性細菌 (*Enterobacter cloacae* GAO) の諸性質

長野 宏子, 大森 正司^{*1}, 矢野 とし子^{*2}
庄司 善哉^{*3}, 西浦 孝輝^{*4}, 荒井 基夫^{*5}

(岐阜大学教育学部, ^{*1} 大妻女子大学家政学部, ^{*2} 目白女子短期大学,
^{*3} 秋田大学教育学部, ^{*4} 中村屋中央研究所, ^{*5} 大阪府立大学農学部)

平成3年3月22日受理

Characterization of *Enterobacter cloacae* GAO Isolated from Soaking Water of Sliced Apple

Hiroko NAGANO, Masashi OMORI,^{*1} Toshiko YANO,^{*2} Zenya SHOJI,^{*3}
Takateru NISHIURA^{*4} and Motoo ARAI^{*5}

Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-11

^{*1} Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102

^{*2} Meiji Women's College, Shinjuku-ku, Tokyo 161

^{*3} Faculty of Education, Akita University, Akita 010

^{*4} Central Laboratories, Nakamura Co., Ltd., Ebina, Kanagawa 243

^{*5} Faculty of Agriculture Chemistry, Osaka Prefectural University, Sakai, Osaka 591

The *Enterobacter cloacae* GAO arisen from plant and *E. cloacae* IAM 12349, *Escherichia coli* IAM 12119 arisen from intestine can be judged by simple methods.

The growth of *Enterobacter cloacae* GAO (abbreviated hereafter as GAO) was stimulated two and three times in optical density by addition of apple juice and casamino acid, respectively.

Cellobiose and xylose were utilized best as carbon sources by GAO, although the latter was slightly utilized by *E. cloacae* IAM 12349 (abbreviated hereafter as IAM 12349).

GAO grew in a wide range of pH 4-10, but *E. coli* IAM 12119 (abbreviated hereafter as *E. coli*) failed below pH 7 and above pH 10.

GAO proved positive in esculin hydrolysis test, while both IAM 12349 and *E. coli* proved negative. Their difference was clearly observed.

(Received March 22, 1991)

Keywords: wheal flour 小麦粉, starter スターター, leavening bacteria 発酵性細菌, *Enterobacter cloacae* エンテロバクター クロアカエ.

1. 緒 言

小麦粉の膨化は、パン酵母、ベーキングパウダーによるものが一般的であるが自然酵母や乳酸菌の関与する報告もみられる^{1)~4)}。野菜種や果実浸漬水などを用いることも伝統的な方法の一つとして伝承されており、著者らはリンゴ浸漬水を用いて発酵、つまりスターターを調製し、その中から発酵に関与している主要発酵性細菌 *Enterobacter cloacae* GAO を単離同定した⁵⁾。また、こ

れが小麦粉食品に及ぼす特徴^{6)~8)}、および急性毒性や感染性の面から検討し安全性について⁹⁾報告した。本細菌は腸内細菌群に属しており、食品衛生検査に用いられているデオキシコレート培地に対して陽性を示すため、実地応用の面で問題を残している。これを解決する方法としては、デオキシコレート培地に対し反応を示す本細菌の有する β -galactosidase の遺伝学的検討や他菌の生産するエンテロトキシンとの関わり等を明らかにすること、

また、現在でも用いられている伝統的な食品の中からスクリーニングを行うことにより新たな膨化性細菌を分離することなどが考えられる。一方、腸内細菌群は他の菌属に簡単にあてはまらない菌が集められており、これらの分離にはまだ多くの問題がある¹⁰⁾¹¹⁾。さらに、*E. cloacae* は植物から多く分離されている¹²⁾にもかかわらず腸内細菌群に属している。著者らは現在の実地応用の問題を解決する一手段として食品衛生法のもとで GAO の諸性質をみることによって腸由来の *E. cloacae* と *E. coli* との簡易判別を行うため研究を行った。その結果、*E. cloacae* GAO とタイプカルチャーである *E. cloacae* IAM 12349 ならびに *E. coli* IAM 12119 とを比較し、生育 pH、糖の資化性、エスクリン分解などの差から GAO と両株を容易に分別することを認めたので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料調製法

リンゴ（青森県産、ふじ、つがる）をよく洗浄後皮をむき、芯を除いたものをおろし金でおろし、メンブランフィルターで除菌し、Brix 4° に希釈したものをリンゴジュースとした。

(2) 使用菌株

Enterobacter cloacae GAO（以下 GAO と略）、*Enterobacter cloacae* IAM 12349（以下 IAM 12349 と略）、*Escherichia coli* IAM 12119（以下 *E. coli* と略）を用いた。

(3) 微生物の培養条件

培養は G 培地¹³⁾、すなわちグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.28 g を蒸留水で 1,000 ml に調製したもの（pH 6.4）を用いて 30℃ で培養を行い、660 nm で吸光度を測定することにより菌体濃度とした。このとき、培地の pH を変化させて増殖度を測定し、至適 pH 条件を測定した。また、炭素源のグルコースの代わりに他の有機酸および糖類を、窒素源のアスパラギンの代わりに天然型 18 種アミノ酸混合物やカザミノ酸を用いて同様に培養を行った。アミノ酸混合物は、L 型 0.06%、DL 型 0.12% の濃度のものを、培地 1,000 ml 当り 10 ml ずつ添加して 18 種アミノ酸混合物とした。アミノ酸としてはスレオニン、グルタミン酸、アルギニン、プロリン、チロシン、メチオニン、バリン、ロイシン、グリシン、シスチン、ヒスチジンの L 型とフェニルアラニン、セリン、トリプトファン、アスパラギン酸、イソロイシン、アラニンの DL 型を用いた。カザミノ酸は、培地 1,000 ml 当り 10 g を加えたものを用いた。

(4) エスクリン分解反応

エスクリンを含む市販エスクリン胆汁培地（Bile Esculin Agar, ディフコ製）を用い、平板培地を調製した。また合成培地として G 培地に 0.1% エスクリン、0.05% 塩化第二鉄を加えた平板培地（G-エスクリン培地）を調製した。これに使用菌株を接種後培養し、その呈色反応から陽性、陰性を判定した。

3. 結果および考察

(1) *E. cloacae* GAO の生育におよぼすリンゴジュースの効果

リンゴ浸漬水より分離した小麦粉発酵性細菌 GAO の生育に及ぼすリンゴジュースの効果を Fig. 1 に示した。

G 培地に、メンブランフィルターで除菌し Brix 4° に希釈したリンゴジュースを加えたものは培養直後から急激な生育を示し、菌の増殖が吸光度で約 2 倍に促進された。データとしては示していないが、リンゴジュース濃度を Brix 2° に希釈したものでは微生物の生育が吸光度で 0.77 であった。この事は 4° のものに対してほぼ同値であり、無添加の場合より良好であった。これは IAM 12349 を用いた場合においても同様で、リンゴ浸漬液から本細菌が分離されたこと⁵⁾と合わせ考察するとリンゴ浸漬液、またはジュースの中に、GAO の生育にとって何らかの促進物質が存在するものと考えられる。

GAO は、腸内細菌群に属しているため、*E. coli* を用いて同じ実験を行ったが *E. coli* に対してはリンゴジュース

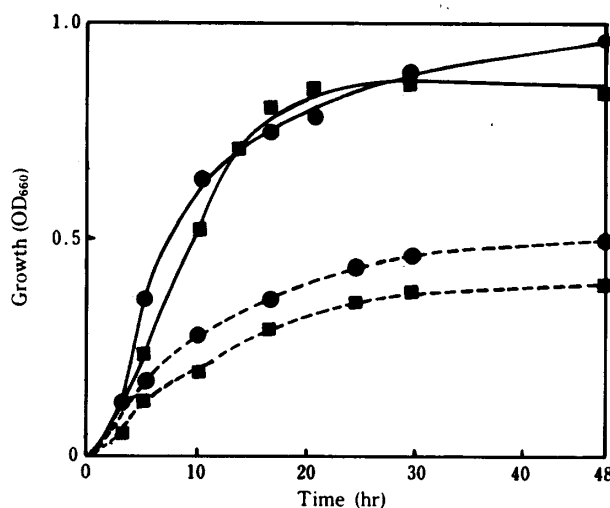


Fig. 1. Changes of growth curve of *Enterobacter cloacae* with and without apple juice

E. cloacae GAO and IAM 12349 in G-media with (—●—), (—■—) and without (---●---), (---■---) apple juice, respectively.

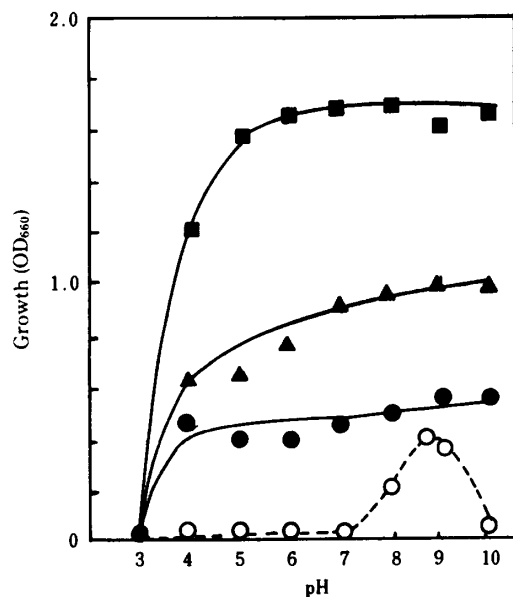
リンゴ浸漬液より分離した発酵性細菌 (*Enterobacter cloacae* GAO) の諸性質

Fig. 2. Effect of pH on growth of *Enterobacter cloacae* GAO and *E. coli* IAM 12119

Casamino acid (—■—) or 18 amino acid (—▲—) was supplemented with G-medium and adjusted to pH 3~10. The strains were grown for 48 hr at 30°C. OD was measured at 660 nm. —●— and —○— are *E. cloacae* and *E. coli* in G-medium alone.

ースの促進効果はほとんどみられなかった。

(2) *E. cloacae* GAO の生育におよぼす pH の影響

GAO の生育に及ぼす pH の影響を Fig. 2 に示した。G培地にカザミノ酸や天然型 18 種アミノ酸混合物を加えたものを用い試験したところ、いずれの培地においても pH 4 から 10 までの広範囲で生育が可能であった。GAO は pH 10 まで生育しているのが観察され、IAM 12349 はほぼ GAO と同様の生育結果であった。*E. coli* は pH 7 以下、pH 10 以上では生育せず、腸内細菌群の指標として用いられている *E. coli* と GAO との相違が明らかであり、これは *E. coli* の混入時、*E. coli* との分離が可能であることを示すものである。

(3) *E. cloacae* GAO の生育におよぼす炭素源の影響

リンゴ酸はリンゴ浸漬水中に存在し、そこから GAO の分離を行ったため、またリンゴジュースは小麦粉発酵を行う GAO の増殖を促進したため、G培地中の炭素源をリンゴ酸をはじめ TCA サイクルに参与する有機酸に置き換えて微生物の増殖を試験し、その結果を Fig. 3 に示した。GAO, IAM 12349 とともにリンゴ中に存在するリンゴ酸に対する資化性には差がなく、フマル酸を炭素源に用いた時には GAO の方が増殖がややよく、逆にクエン酸、酒石酸の場合では IAM 12349 の方が増殖が

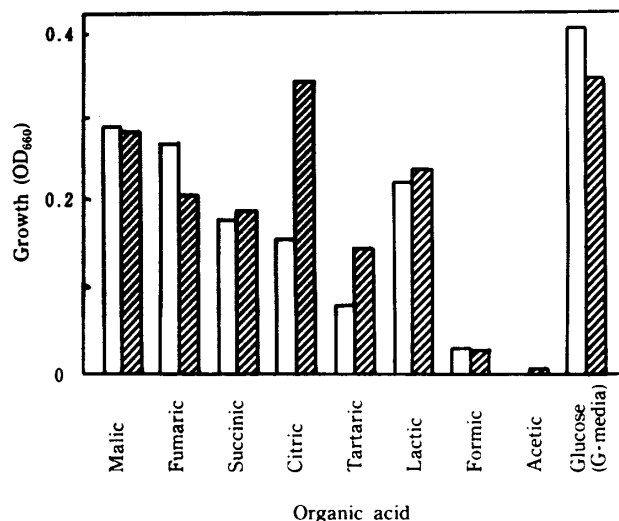


Fig. 3. Utilization of organic acids in *Enterobacter cloacae*

E. cloacae GAO (□) and IAM 12349 (▨) were cultured in G-modified media with some kinds of organic acids instead of glucose for 48 hr at 30°C. OD was measured at 660 nm.

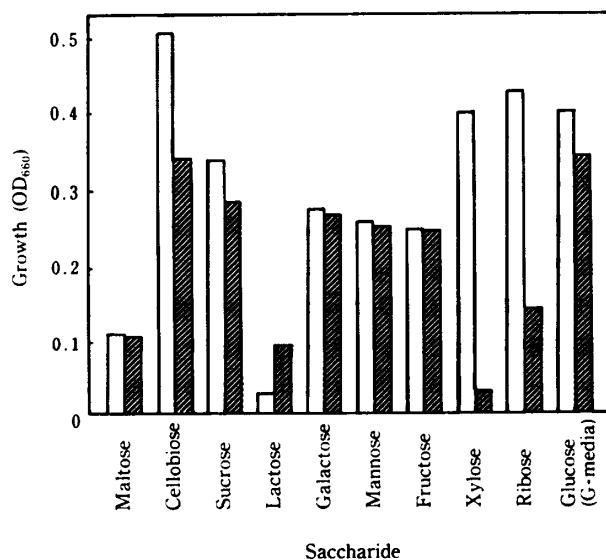
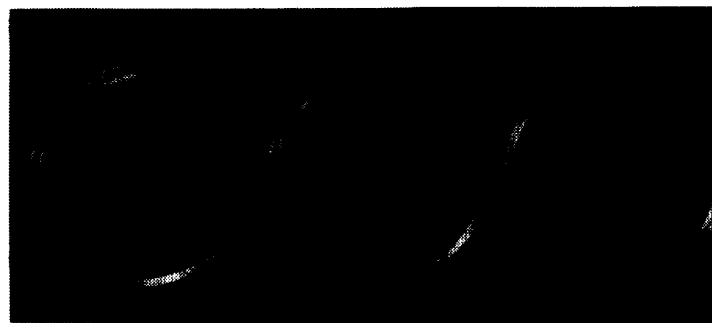


Fig. 4. Utilization of saccharides in *Enterobacter cloacae*. *E. cloacae* GAO (□) and IAM 12349 (▨) were cultured in G-modified media with some kinds of saccharides instead of glucose for 48 hr at 30°C. OD was measured at 660 nm.

よかった。ギ酸、酢酸などのモノカルボン酸では GAO, IAM 12349 とともに細菌の増殖はほとんど認められなかった。またクエン酸、フマル酸の GAO と、IAM 12349 に対する増殖が異なっていた。特にクエン酸を添加した場合、GAO に比べて IAM 12349 の増殖がよかった。データとして示していないが、炭素源として有機酸を変え



A B C
Fig. 5. Esculin hydrolysis of *Enterobacter cloacae* GAO

A : *E. cloacae* GAO ; B : *E. cloacae* IAM 12349 ;
C : *E. coli* IAM 12119.

ることによって、CO₂、H₂の発生量、比率が異なるため¹⁴⁾、その経路については今後の課題として検討したい。

G培地中の炭素源を、リンゴジュース中に存在する果糖、ブドウ糖、ショ糖¹⁵⁾、およびラクトース等の各種糖類に置き換えて微生物の増殖を試験した結果を、Fig. 4に示した。リンゴ中に含まれているショ糖ではGAOの方が細菌の増殖度はわずかに大きく、果糖は、ほぼ同じ値を示した。IAM 12349に比較してGAOの増殖がきわめて大きく、認められた糖はセロビオース、キシロース、リボースで、特にキシロースは顕著であった。逆にラクトースの資化性はGAOよりIAM 12349の方が大きく認められた。これらがIAM 12349の生理上との相違点であると考えられた。

(4) *E. cloacae* GAOのエスクリン分解とその応用

現在用いられている簡便な大腸菌群テストに、デオキシコレート培地が用いられており、この培地に対してGAOは陽性を示す。したがってGAOと大腸菌とは食品衛生法上は大腸菌群として扱われ、食品工業への実用化は困難な状況にある。GAOとIAM 12349では、Bergey's Manual¹⁶⁾の記載内容のエスクリン分解に差がある⁵⁾。この特徴を大腸菌にまで広げて検討を行った。つまり、市販胆汁エスクリン培地にコロニーを作らせ、エスクリン分解反応の結果をFig. 5に示した。GAOは、IAM 12349や*E. coli*と異なり、エスクリンを分解して黒色の反応がみられた。G培地にエスクリンと塩化第二鉄を加えた合成培地(G-エスクリン培地)を作り観察を行った結果、GAOは増殖がよく、市販エスクリン培地と同様に黒色反応がみられた。これに対し*E. coli*の方は生育が悪く、黒色反応が観察されなかった。これらのことから、*E. coli*の混入が疑われた場合、市販胆汁エスクリン培地およびG-エスクリン合成培地を用いるこ

とによってGAOと*E. coli*との相違点を明らかにすることが可能であるし、IAMとの違いを見出すためにも有効であると考えられる。また、実際に*E. coli*が混入しても培養時のpHを調整すればGAOのみを*E. coli*と分別して選択的に培養することが可能であると考えられる。

簡易判別法開発のため以上の結果をTable 1に示した。GAO、IAM、*E. coli* 3株のリンゴジュース中の増殖および生育に及ぼすpHの範囲より*E. cloacae*と*E. coli*と判別ができ、有機酸、糖およびエスクリン分解により植物由来のGAOと腸由来のIAM 12349との判別が可能であった。リンゴ浸漬液から分離したGAOは、大腸菌群に属するものではあるが、マウスを用いた実験でも安全性に何ら問題はなく⁹⁾、また生育pH、糖の資化性、エスクリン分解などの諸性質は、植物由来の*E. cloacae*

Table 1. Characterization of growth of *E. cloacae* GAO, IAM 12349 and *E. coli* IAM 12119

Growth factor	<i>E. cloacae</i> GAO	<i>E. cloacae</i> IAM 12349	<i>E. coli</i> IAM 12119
Effect of apple juice	+	+	-
pH of G-medium	4-10	4-10	8-9
Organic acid			
Citric acid	+	++	
Fumaric acid	++	+	
Saccharide			
Xylose	+++	T	
Ribose	+++	+	
Cellobiose	++	+	
Lactose	+	++	
Esculin hydrolysis	+	-	-

T: trace.

リンゴ浸漬液より分離した発酵性細菌 (*Enterobacter cloacae* GAO) の諸性質

に普遍的な性質である。現在では酵母を用いた食品の製造が一般的であるが、東南アジア²⁾¹⁷⁾、日本¹⁸⁾をはじめ世界各地¹⁹⁾²⁰⁾の伝統的な食品の中にはさまざまな微生物が存在し食品の特徴を出している。そのような微生物の一つである GAO は有益な株であり、さらに伝統的な食品中の微生物の分布を地球規模で再確認することも必要であると考ええる。

4. 要 約

植物由来の *Enterobacter cloacae* GAO と、腸由来の *E. cloacae* IAM 12349, *E. coli* IAM 12119 との簡易判別法開発のための検討を行った。

(1) *E. cloacae* GAO の生育はグルコース、アスパラギンを含む G 培地にリンゴジュースを添加すると約 2 倍に、カザミノ酸を添加すると約 3 倍に促進された。

(2) GAO の炭素源としてはリンゴジュース中に存在するブドウ糖とショ糖が IAM 12349 に比べよく資化された。セロビオース、リボースがよく資化されており、特にキシロースは IAM 12349 ではごくわずかな資化性であるが、GAO ではよく資化された。

(3) GAO は、pH 4 から 10 までの広い範囲で生育が可能であり、*E. coli* は pH 7 以下、pH 10 では生育せず、また GAO はエスクリン分解陽性であったが、IAM 12349, *E. coli* は陰性であり相違が明らかであった。

以上の結果より簡易判別法になりうるものであった。

本研究の一部は平成 2 年度文部省科学研究費補助金 (一般 C, No. 01580054) の助成を受けて行ったものである。

引 用 文 献

- 主婦の友社編：中国料理の基礎，主婦の友社，東京，118 (1957)
- 武田泰輔，岡田早苗，小崎道雄：日食工誌，**31**，642 (1984)
- 中尾佐助：料理の起源，日本放送協会，東京，49 (1972)
- 高木和夫：食からみた日本史一下，芽ばえ社，東京，223 (1987)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：農化，**61**，357 (1987)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：家政誌，**38**，865 (1987)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：家政誌，**40**，221 (1989)
- Nagano, H., Omori, M. and Shoji, Z.: *J. Food Sci.*, **56**, 106 (1991)
- Nagano, H., Kasuya, S., Omori, M., Yano, T. and Shoji, Z.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1301 (1988)
- Cowan, S.T. and Steel, K.J.: 医学細菌同定の手びき，第 2 版 (坂崎利一訳)，近代出版，東京，139 (1983)
- Brenner, D.J.: *The Prokaryotes* (ed. by Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A. and Schleagel, H.G.), Springer Verlag, Berlin, 1105 (1981)
- Ayres, C., Mundt, J.O. and Sandine, W.E.: *Microbiology of Foods*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 33 (1980)
- Kramer, V.C., Calabrese, D.M. and Nickerson, K.W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 973 (1980)
- 長野宏子，矢野とし子，大森正司，庄司善哉，植木俊博，西浦孝輝：日本農芸化学会大会研究発表要旨集，352 (1989)
- 野呂昭司，工藤仁郎，橋和丘陽：園芸誌，**57**，381 (1988)
- Buchanan, R.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 325 (1977)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉：日本家政学会大会研究発表要旨集，86 (1991)
- 長野宏子，大森正司，庄司善哉，植木俊博，西浦孝輝：日本家政学会大会研究発表要旨集，49 (1989)
- Okada, S., Ishikawa, M., Yoshida, I., Uchimura, T., Ohara, N. and Kozaki, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 572 (1992)
- Mohammed, S. I., Steenson, L. S. and Kireleis, A. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2529 (1991)