

嫌気性培養および好気性培養によるキムチの一般生菌数ならびに腸内細菌科に属する細菌群について

Anaerobic and Aerobic Bacteria Counts and *Enterobacteriaceae* isolated from Kimuchi

角野 猛*
(Takeshi Sumino)

会田久仁子*
(Kuniko Aida)

金子憲太郎*
(Kentaro Kaneko)

金田 尚志*
(Takashi Kaneda)

This study was carried out to clarify the microorganism of Kimchi. The results were as follows;

1. Anaerobic and aerobic bacteria Counts isolated from Kimuchi were $10^2 \sim 10^8/\text{g}$ and $10^3 \sim 10^8/\text{g}$, respectively.
2. The microflora (134 strains) isolated from Kimchi was classified into gram positive rods (106 strains), gram positive coccus (19 strains) and gram negative rods (9 strains).
3. The genus of Family *Enterobacteriaceae* (53 strains) isolated from Kimchi was consisted of *Enterobacter* (36 strains), *Serratia* (2 strains), *Klebsiella* (3 strains), *Hafnia* (1 strain) and others.

はじめに

キムチは韓国の伝統食品であり、その発酵に関与する微生物としては *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus fecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetic bacteria* やカビなどが知られている¹⁾。キムチにおけるこれらの微生物はキムチの保存温度、塩分濃度などによってその生育が左右されるが、一般に低塩、低温で発酵させるのが望ましいとされている²⁾。

また、キムチの味は乳酸量が多い程良いとされ³⁾、その乳酸発酵微生物としては上述の微生物および様々な嫌気性細菌の関与も推測される。更に、腸内細菌科の細菌も発酵産物として乳酸等を生成することから、キムチの熟成、発酵には重要な役割を担っていると考えられる。しかし、キムチの嫌気培養による生菌数および腸内細菌科の微生物に関する報告は少ない³⁾。

著者らは先にキムチの嗜好実態、細菌汚染、脂肪酸組成、ナトリウム及びカリウム量及び遊離アミノ酸組成などについて報告したが⁴⁻⁷⁾、今回、嫌気培養によって分離した生菌数および腸内細菌科に属する細菌を検討して若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験に用いたキムチは1993年3月中旬に韓国ソウル市内の食料品店で購入した食用適期の白菜キムチ12検体、大根キムチ3検体等計21検体でその詳細をTable 1に示した。これらは冷蔵保存(5~7°C)し、2日以内に日本に持ち帰り直ちに実験に供した。

Table 1. Experimental materials

Variety	Number
Ark shell	1
Chinese cabbage	12
Japanese radish	3
Chingentsuai	1
Peas pods	1
Cucumber	1
Menma	1
Welsh-onion leaf-blade	1
Total	21

2. 試料の調製および培養方法

試料10gを90mlの滅菌リン酸緩衝液と共にストマッカー(Seward medical UAC House製, Lab-blender 80)で乳状化したものを試料の原液として以下の生菌数の測定に用いた。

嫌気性菌の培養には嫌気性菌培養装置(平山製FA-M

* 郡山女子大学

シリーズ、炭酸ガス置換)を用いた。また、培地は嫌気性菌選択分離用 GM 加 GAM 寒天培地(日水製)を用い、同培地の平板上に各段階に希釈した試料 0.1ml を塗抹し 35°C、48 時間培養後の発育コロニー数を嫌気培養による生菌数とした。

また、食品衛生検査指針⁸⁾に準じて標準寒天培地を用いて 35°C、48 時間培養後の発育コロニー数を好気培養による一般生菌数とした。

3. 分離菌の形態観察

韓国の代表的なキムチである白菜を主材料とする白菜キムチ 4 検体 (No. 1, 2, 12, 13) を細菌の分離試料とした。これらの 4 検体は製造業者が異なること、およびいずれも瓶詰にされていることから白菜キムチの全体像を把握する上において適切と判断した。形態観察は嫌気培養の GM 加 GAM 寒天培地上に発育したコロニーを 79 株および同一検体の好気培養の一般生菌数測定用の標準寒天培地上に発育したコロニーを 55 株、計 134 株を分離し、単染色、芽胞染色およびグラム染色によって行った。なお、分離した嫌気培養菌はガスバック法を用いて保存した。なお、芽胞染色はメーラーの方法⁹⁾、グラム染色はハッカーの変法⁹⁾により行った。

4. キムチからの腸内細菌科細菌の分離、同定

腸内細菌科菌属の分離に用いた実験材料は分離菌の形態観察に用いたものと同一の白菜キムチ 4 検体を用いた。分離はマッコンキー寒天培地(栄研製)の平板に、滅菌リン酸緩衝液で各段階に希釈した試料を 0.1ml 塗抹し、35°C、24 時間、前記 2 と同様な方法で、嫌気培養および好気培養後、発育したコロニーを無作為に分離した。これら純培養菌について、グラム染色、ブドウ糖の分解、硝酸塩の還元、チトクロームオキシダーゼテストなどの各種性状検査を行い、53 株を腸内細菌科に属する細菌と同定した。

また、菌属、菌種の同定は腸内細菌同定キット (API 20, 日本ビオメリュー社製) を用いて 20 種の生物学的性状を検査して行った¹⁰⁾。

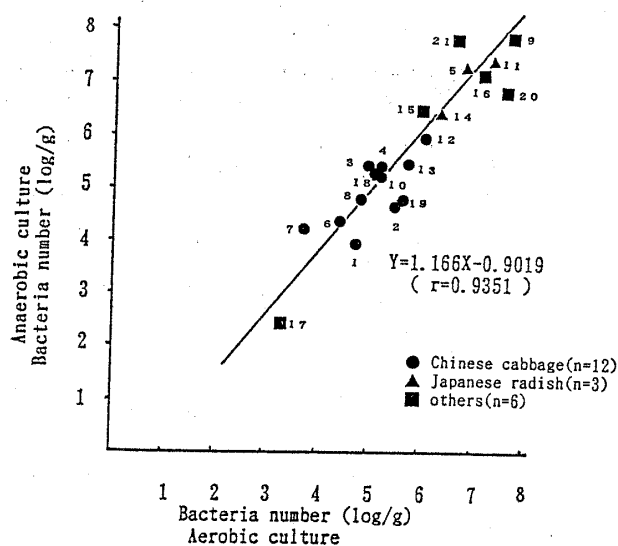


Fig. 1. Correlation between aerobic and anaerobic bacteria number of Kimchi.

Notice: Number indicate the sample number of Kimchi.

実験結果および考察

1. キムチの生菌数

嫌気培養および好気培養による生菌数の測定結果を Fig. 1 に示した。

嫌気培養で $10^2 \sim 10^8$ /g、好気培養で $10^3 \sim 10^8$ /g の範囲にあり、対数平均値はそれぞれ 5.64/g および 5.61/g であって、近似した値をとった。調査検体数の多かった白菜キムチ 12 検体 (No. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 18, 19) についてみると、嫌気培養および好気培養共に、 $10^3 \sim 10^8$ g の範囲にあり、両培養とも、大根および他のキムチよりも生菌数が少ない傾向が認められた。なお、嫌気培養の場合と好気培養の場合の生菌数の間の相関係数は 0.9351 ($p < 0.001$) で、強い正の相関が認められ、その関係式は $Y = 1.166X - 0.9019$ (Y は嫌気培養による生菌数、 X は好気培養による生菌数を示す) で表された (Fig. 1)。

Woodburn 等³⁾ はキムチのビタミン B₁₂ およびアスコルビン酸の定量実験において同時に嫌気性菌数および

Table 2. Gram stains of bacteria isolated from Kimchi

Gram stains	Aerobic culture		Anaerobic culture		Total	
	Number of strains	Ratio (%)	Number of strains	Ratio (%)	Number	Ratio (%)
Positive rods (spore)	10	18.2	0	0	10	7.5
Positive rods (Non spore)	28	50.9	68	86.1	96	71.6
Negative rods	3	5.5	6	7.6	9	6.7
Positive coccus	14	25.4	5	6.3	19	14.2
Total	55	100.0	79	100.0	134	100.0

嫌気性培養および好気性培養によるキムチの一般生菌数ならびに腸内細菌科に属する細菌群について

Table 3. Classification of Family *Enterobacteriaceae* isolated from Kimchi

Characteristics	<i>Enterobacter</i>			<i>Serratia</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	Not identified
	<i>agglomerans</i>	<i>intermedium</i>	<i>cloacae</i>	<i>liquefacience</i>	<i>nigrifluens</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>alvei</i>	
β -galactosidase	+	+	+	+	—	+	+	
Arginine	—	—	+	—	—	—	—	
Lysine	—	—	—	+	—	+	+	
Ornithine	—	+	+	+	—	—	+	
Citric	+, —	—	+	+	—	+	+, —	
H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	
Urease	—	—	—	—	—	+	—	
Tryptophan deaminase	—	—	—	—	—	—	—	
Indole	+, —	—	—	—	—	—	—	
VP test	+, —	—	+	+	+	+	+	
Gelatin	—, +	—	—	+	+	—	—	
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	
Inositol	+, —	—	—	+	+	+	—	
Sorbitol	—, +	+	+	+	+	+	—	
Rhamnose	+	+	+	—	+	+	+, —	
Saccharose	+, —	+	+	+	+	+	—	
Melibiose	+	+	+	+	+	+	—	
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+, —	
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+, —	
Incubation method	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.	Aero. Anaer.
Bacteria number	14 10	2 0	3 7	2 0	2 0	2 1	0 1	4 5
Total number (53)	24	2	10	2	2	3	1	9
Ratio (%)	45.2	3.8	18.9	3.8	3.8	5.7	1.9	16.9
Sample No. 1 (14)	2	2	0	2	2	2	0	4
2 (15)	2	0	9	0	0	1	1	2
12 (21)	17	0	1	0	0	0	0	3
13 (3)	3	0	0	0	0	0	0	0

Tested bacteria number was 53.

Identification of Bacteria has been done by API identification kit 20E, profile index (Japan bio MÉRIEUX Vitek, Ltd).

Lactobacilli 菌数を測定し、両菌数とも 4°C, 4 週間発酵したものは $10^7 \sim 10^8$ /g になることを報告している。また、鄭¹¹⁾はキムチの発酵を 4 段階に分け、第 2 段階において嫌気性菌の乳酸菌が多くなり他の微生物を抑制するのでこの時が熟成の最適期であると報告している。本実験に用いたキムチは食用適期とされるものをを用いたが嫌気性菌数は Woodburn 等³⁾の結果より少なく、鄭¹¹⁾の言う第 2 段階以前の熟成状態にあるものと考えられた。なお、本実験における嫌気培養による細菌数は通性嫌気性菌および偏性嫌気性菌の両方を含むと考えられ、また好気培養による細菌数は好気性菌および通性嫌気性菌両方を含むと考えられる。従って、培養法による生菌数の相違は偏性嫌気性菌と偏性好気性菌数の差異によるものと考えられた。

2. 分離菌の形態観察

白菜キムチの好気培養および嫌気培養により分離した

計 134 株について形態観察の結果を Table 2 に示した。

両培養ともグラム陽性芽胞桿菌が最も多く、それぞれ 50.9%, 86.1% を占めていた。これらは通性嫌気性菌の *Lactobacillus* 属細菌と考えられる。次いで、好気培養ではグラム陽性球菌、グラム陽性有芽胞桿菌が、嫌気培養ではグラム陰性桿菌、グラム陽性球菌がそれぞれ多かった。分離培地上の性状などから、上記グラム陽性球菌は *Micrococcus* 属、グラム陽性有芽胞桿菌は *Bacillus* 属の細菌と考えられた。

宮尾¹⁾はキムチ発酵の初期は *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* などのグラム陰性桿菌の増殖が見られ、発酵の進行につれて各種乳酸菌が増殖し、ぬかみそ漬け、サワークラウト、発酵ピクルスと同様な傾向を示すと報告している。本実験の白菜キムチではグラム陰性桿菌は好気および嫌気培養でそれぞれ、5.5% および 7.6% で少なかった。前述の嫌気培養および好気培

養による生菌数測定の結果と本結果から判断すると、これらの白菜キムチは熟成途中のキムチと考えられた。

3. 分離腸内細菌科の同定

マッコンキー寒天培地上のコロニーを釣菌し、腸内細菌科の細菌と同定されたのは白菜キムチ No. 1, 2, 12 および 13 より、好気培養でそれぞれ 12, 3, 13, 1 株、嫌気培養でそれぞれ 2, 12, 8, 2 株であり、No. 13 の白菜キムチの分離菌株数は少なかった。これらについて菌属、菌種を示したものが Table 3 である。

Enterobacter 属がいずれの検体からも最も多く検出され、全体では 36 株、67.9% であり、本菌属が白菜キムチの主要な腸内細菌科菌属と考えられた。次いで、*Serratia*, *Erwinia*, *Klebsiella* および *Hafnia* 属が分離された。

なお、検体別に菌種を見ると、No. 12, および No. 13 は *Enterobacter* 属が分離腸内細菌の 85.7% および 100.0% を占め、No. 1 および No. 2 の 28.6%, 73.3% を上回った。そこで、Fig. 1 に示したこれらの 4 検体 (No. 1, 2, 12, 13) の白菜キムチの生菌数との関連を見ると、No. 12 が好気および嫌気培養共に 10^6 /g と最も多く、次いで No. 13 が 10^5 /g 台と多かったが、No. 1 および No. 2 は 10^4 /g 台であり少なく、生菌数が多くなるにつれて *Enterobacter* 属細菌が中心になって行く傾向が認められた。従って本菌属の変動は白菜キムチの発酵の程度の指標になることも考えられるが、その詳細については今後検討したい。

なお、*Enterobacter* 属は人や動物の正常な腸内細菌叢の 1 部分を構成する菌種で、自然界にも広く分布している¹²⁾。著者ら¹³⁾は先に、本菌属についてブドウ糖中間代謝産物を検討し、ブドウ糖から主として乳酸およびギ酸を生成し、培養時間の経過に伴いギ酸は減少し、主たる有機酸は乳酸となることを報告した。なお、同様に、*Serratia liquefacience*, *Klebsiella pneumoniae* もブドウ糖より乳酸、ギ酸を生成するものであることを報告した¹³⁾。従って、これら腸内細菌科の細菌、特に、分離比率の高かった *Enterobacter* 属細菌は白菜キムチの乳酸発酵に関与しているものと推測された。

要 約

キムチの生菌数を好気培養および嫌気培養法による測定、分離菌の形態観察および腸内細菌科の菌属、菌種の

同定を行い、次の知見を得た。

1. 好気培養および嫌気培養法による生菌数は、それぞれ、 $10^2 \sim 10^8$ および $10^3 \sim 10^8$ /g であり、培養法による生菌数には大きな相違は認められなかった。
2. 好気および嫌気培養共にグラム陽性の無芽胞桿菌が最も多く分離された。
3. 分離された腸内細菌科の 53 株の菌属は *Enterobacter* が最も多く、67.9% を占めていた。次いで、*Serratia* 属、*Erwinia* 属、*Klebsiella* 属、*Hafnia* 属の細菌であった。

本研究は平成 6 年度文部省科学研究費補助金（国際間学術研究、代表金田尚志郡山女子大学教授）によったものである。

文 献

- 1) 宮尾茂雄: *New Food Industry*, 1, 6 (1987)
- 2) 鄭 大馨: 食の科学, 1, 28 (1987)
- 3) Ro, S.L., Woodburn, M., and Sandine W.E.: *J. Food Sci.*, 44, 873 (1979)
- 4) 会田久仁子, 角野幸子, 橋本美津子, 横堀亜希子, 金子憲太郎, 角野 猛: 調理科学, 23, 206 (1990)
- 5) 会田久仁子, 角野 猛, 山田幸二, 角野幸子, 柳大河, 黄鎬観: 比較文化研究, 18, 11 (1991)
- 6) Aida, K., Sumino, T., Kaneko, K., Yamada, K.: 比較文化研究, 22, 129 (1993)
- 7) Sumino, T., Aida, K., Fujiwara, K., Yamada, K.: 比較文化研究, 24, 74 (1993)
- 8) 厚生省環境衛生局監修: 食品衛生検査指針 I, p. 117, 食品衛生協会 (1973)
- 9) 新井武利, 金子精一, 工藤泰雄: 最新微生物検査の実践, 54, 衛生技術協会 (1979)
- 10) 日本バイオメリーバイテック株式会社: アピプロフィルインデックス, 東京 (1992)
- 11) 鄭 大 馨: 調理科学, 27, 302 (1994)
- 12) Wilson, G.S., Miles, A.A.: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, p. 839, Edward Arnold, London (1986)
- 13) 角野 猛: 家政誌, 31, 546 (1980)

(平成 7 年 1 月 10 日受理)