

原 著

醗酵食肉製品に用いる有用細菌の食塩による 生育阻害に対するアルギニンの緩和効果

関川 三男・河村 多美・藤井はるか・島田謙一郎・福島 道広・三上 正幸
帯広畜産大学, 帯広市 080-8555

Effect of arginine on growth of lactic acid bacteria for fermented sausage under high concentration of salt

M. SEKIKAWA, T. KAWAMURA, H. FUJII, K. SHIMADA, M. FUKUSHIMA and M. MIKAMI

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine Laboratory of Meat Science
Obihiro, Hokkaido, 080-8555, Japan

キーワード：醗酵食肉製品, 乳酸菌, 食塩, アルギニン

Key words: fermented meat, lactic acid bacteria, salt, arginine

Abstract

In this study, the effect of arginine (Arg) of the NaCl induced growth inhibition was examined for *Sta. carnosus* and *P. acidilactici* which isolated from the commercial starter culture of fermented sausage. When Arg and/or NaCl were added to MRS broth and cultured with shaking, the differences were not recorded in the broth pH, the nitrate reduction activity, and the protein degradation activity. However, the viable count of both strains had decreased by adding NaCl. The addition of Arg has increased the number of recovered cell and it was remarkable in *Sta. carnosus*. Arg added broth was metabolized by both strain, the content of Arg in broth was decreased, especially it was disappeared in cultured broth of *Sta. carnosus*. SEM photographs showed an enlarged and cohesive morphology of both spheroidal strains by adding NaCl to the broth. Addition of Arg, this tendency was decreased in *P. acidilactici*, whereas a small wrinkle on the surface of *Sta. carnosus*. It was thought that, the two bacterial strains used in this study, the growth inhibitory effect caused by high concentration of NaCl was partly recovered by the addition of Arg to the broth.

要 旨

本研究では、醗酵食肉製品用のスターターとして用いられている *Staphylococcus carnosus* および *Pediococcus acidilactici* を供試菌として高濃度の食塩による生育阻害に対するアルギニンの効果を検討した。MRS 液体培地に食塩あるいはアルギニンを添加して振盪培養を行うと、培養後の培地 pH, 硝酸塩還元活性およびタンパク質分解活性には両供試菌ともに食塩あるいはアルギニンの有無による差異が認められなかった。生菌数は食塩の添加によって減少したが、アルギニンを添加すると食塩による減少が軽減され、これは *Sta. carnosus* で著しかった。両供試菌ともに添加したアル

ギニンは培地中で減少し、特に、*Sta. carnosus* では枯渇した。一方、食塩あるいはアルギニンの添加は乾燥菌体のアミノ酸組成に大きな影響を与えなかった。走査型電子顕微鏡像から、両供試菌ともに食塩の添加は菌体の膨化、凝集を促し、アルギニンの添加によって *P. acidilactici* では、この傾向が低減したが、*Sta. carnosus* では菌体表面に皺様の構造が観察された。以上の結果から、今回用いた供試菌において、添加したアルギニンは資化され食塩による生育阻害に対して緩和的に作用するものと考えられた。

緒 言

醗酵食肉製品（非加熱食肉製品）は、独特の風味を醸成させるために加熱処理を行わない。これらの製造に当たっては、高い食塩濃度を維持し、さらに温度・

受理 2003年2月12日

湿度を制御して腐敗性あるいは病原性微生物の増殖を阻止する必要がある。さらに高品質な製品を安定的に供給するために、原料肉に有用微生物をスターターとして添加する方法が一般化している(三浦, 1987)。しかし、原料肉に加えられた高濃度の食塩等によって乳酸菌などの有用細菌の代謝が阻害され、スターターとして期待される効果が十分に得られないこともあり、使用する微生物の組み合わせや菌種には一般化した方法が知られていない。

そこで、今回、微生物に対して浸透圧の緩和作用や水分活性の調節作用が期待されるアミノ酸等(山本, 1996)、特にアルギニンに注目して、醗酵肉製品の乾燥工程で生じる高食塩濃度環境下において、スターターとして加えられた微生物の生育に対するアミノ酸等の影響を検討した。

研究方法

1) 供試菌株

本実験に用いた菌株は、市販の醗酵ソーセージおよび醗酵ソーセージ用スターターから本研究室において単離・保存されている *Staphylococcus carnosus* M72, *Staphylococcus xylosum* 2M86, *Pediococcus acidilactici* P120, *Pediococcus pentosaceus* P120 および *Lactobacillus sake* L110 の5菌株である。

これらの菌株は MRS 寒天斜面培地 (OXOID) に穿刺し、37°C で24時間培養後、5°C の冷蔵庫に保存し、約20日毎に植え継ぎを行ったものである。前培養は、供試菌を10 mL の MRS 液体培地に、1白金線釣菌、接種後、よく攪拌してから、37°C で18時間行った。なお、振盪培養を行うに当たっては、濁度(660 nm, Ubest-50 日本分光)を用いて菌数を推定した。

2) 細菌の生育に対する食塩の影響

食塩濃度(5, 8, 10, 13, 15%)を変えた MRS 液体培地を L 字型試験管に、それぞれ14 mL ずつ分注し、あらかじめ前培養した供試菌を1 mL 接種し、37°C で約5日間振盪培養(20 rpm, バイオフォトレコーダー-TN-112D, 東洋)して生育曲線を得た。食塩による生育阻害は、この生育曲線の形態から判断した。

3) 供試菌の食塩による生育阻害を緩和するアミノ酸関連化合物の影響

供試菌および食塩濃度としては、*Sta. carnosus* は13%, *P. acidilactici* は8%とした。MRS 液体培地に、アルギニン、グルタミン、アラニン、ベタイン、グルタミン酸をそれぞれ0.5% (w/v) 加え、これを L 字型試験管に14 mL ずつ分注し、前培養した供試菌を1 mL ずつ接種し、37°C で5日間振盪培養を行った。

4) pH および生菌数の測定

振盪培養後の培養液を遠心分離し、上澄の pH (pH Boy-P2) を測定した。生菌数の測定は、*Sta. carnosus* では標準寒天培地(栄研)を、*P. acidilactici* は MRS 寒天培地を用い平板混釈培養法により37°C 48時間培養しコロニー数を数えた。

5) プロテアーゼ活性および硝酸塩還元活性

食塩を最終濃度5%となるように添加した MRS 寒天培地に、その1/3容量の15%スキムミルク水溶液を加え平板培地を作製し、供試菌を1白金線、釣菌し接種した。これを37°C で24時間あるいは20°C で4日間培養し、形成されたクリアゾーンの大きさからプロテアーゼ活性の有無を判断した。硝酸塩還元活性は、MRS 液体培地に硝酸カリウム0.1% (w/v) を混合し、培地中の亜硝酸根を公定法に従って測定した。

6) 培養液中の遊離アミノ酸および乾燥菌体のアミノ酸組成

MRS 液体培地を対照として、これに0.5%アルギニンおよび食塩(*Sta. carnosus*: 13%, *P. acidilactici*: 8%)を加え、これに前培養した供試菌1 mL を接種し、37°C で5日間振盪培養した。培養後、遠心分離(4000 rpm, 15°C, 15分, Himac CR 21 HITACHI)し、菌体と培養上澄を得た。培養上澄は、濾過後、ロ液に等量の8%TCA溶液を加え、この遠心上澄をマイジョリディスク(WP-25, TOSO)に通し、この4%TCA可溶性画分を培養液の遊離アミノ酸分析用の試料とした。遠心分離で集菌した菌体は、生理的食塩水で2回遠心洗浄した後、さらに50, 75, 100%のアセトン(アセトン, 蒸留水, v/v)で遠心洗浄した。この沈殿に少量の100%アセトンを加えドラフト内で乾燥させた。この乾燥菌体の一部を恒温器(100°C, 24時間)で、さらに乾燥後、約1 mg を精秤後、6 N塩酸を約2 mL 加えて溶解させ、窒素を封入し、110±1°C (ブロックヒーター)で24時間、加水分解した。試験管を開封後、エバポレーター(55°C)を用いて塩酸を完全に除去し、0.2 N塩酸を加え0.5 mL とした。これらの試料50 μl をアミノ酸分析装置(Model 835, 日立)に供し、得られた結果はアミノ酸重量で表した。

7) 走査型電気顕微鏡による菌体の形態観察

供試菌の乾燥菌体は、アミノ酸分析用のものを用いた。これを少量のアセトンに懸濁し、イオンクリーニングを施したスライドガラス上に滴下し、37°C で2時間放置した後、金蒸着(イオンコーター-IB-3, EIKO)を行い試料とした。走査型電子顕微鏡(日本電子製JSM-6301F型)観察は、加速電圧15 kV, 倍率20,000倍で行った。

結 果

1) 供試菌の選択および食塩濃度の決定

今回用いた供試菌を種々の食塩濃度のMRS液体培地で振盪培養を行い、得られた生育曲線から食塩による生育阻害を判断した。その結果、*L. sake*は前培養においては濁度(吸光度)が1.2まで上昇したが、食塩存在下における振盪培養では濁度上昇が認められなかった。*Sta. xylosus*は、前培養においても濁度が0.2までしか上昇しなかった。また、*P. pentosaceus*は5%食塩濃度で振盪培養を行うと、濁度上昇が0.5程度であった。すなわち、この3菌株は食塩による生育阻害が著しいために、今回の実験では用いないこととした。そこで、5%食塩存在下の振盪培養で濁度上昇が約1.0以上となった*Sta. carnosus*および*P. acidilactici*を本実験の供試菌とした。

これら供試菌の耐塩性は、MRS液体培地に食塩を0, 5, 8, 10, 13および15%添加し、典型的なS字状の生育曲線が得られる限界の濃度とした。その結果、*Sta. carnosus*では13%, *P. acidilactici*では8% (図1)であった。

2) 供試菌の食塩による生育阻害を緩和するアミノ酸等の検索

供試菌の高濃度食塩による生育阻害を緩和するアミノ酸等を検索するためにアラニン、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、リジンおよびベタインに注目し、それぞれ別個に培地に0.5% (w/v)を添加して、振盪培養を行った。*Sta. carnosus*において食塩存在下(13%)でベタインおよびグルタミン酸の添加は、定常期の濁度を低下させたので阻害的に作用すると判断した。また、アルギニンを除く他のアミノ酸の添加では、定常期の濁度が無添加の場合とほぼ同等となったが、誘導期が延長された。アルギニンの添加は、定常期の濁度が食塩のみ添加の場合に対し約19%回復し、また誘導期の長さにも影響を与えなかった。このときの典型的な生育曲線を図2に示した。*P. acidilactici*においては食塩存在下(8%)でリジンあるいはベタインを

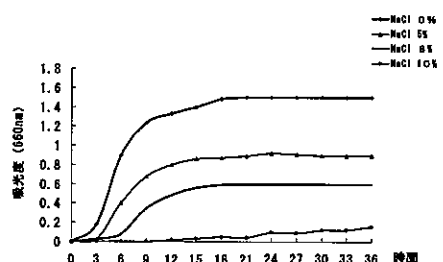


図1 *P. acidilactici*の生育に対する食塩濃度の影響
MRS液体培地に各濃度の食塩を添加し、*P. acidilactici*を振盪培養(37°C)を行った時の典型的な生育曲線

添加すると食塩のみの場合に比べて濁度が低下した。供試した他のアミノ酸の添加では、食塩のみの場合に比べ定常期の濁度が同等あるいはそれ以上になった。特に、アルギニンを添加すると、定常期の濁度を約16%回復させた。そこで、本実験では、アミノ酸関連物質の中で特に効果が高いと考えられたアルギニンに注目して以後の実験を行った。

3) 培養後のpHおよび生菌数

振盪培養後の培地のpHは、両供試菌ともに食塩およびアルギニン添加の有無にかかわらず、*Sta. carnosus*では4.4から4.6、*P. acidilactici*では3.9から4.1と、大きな差異はなかった。

生菌数では*Sta. carnosus*において、無添加の8.7 (log cfu/mL)から13%食塩添加で6.8に減少したものが、アルギニンの添加によって7.4まで回復した。一方、*P. acidilactici*では無添加の7.7 (log cfu/mL)から8%食塩添加で5.7に減少し、アルギニンの添加によって僅かに(5.9)回復した。

4) タンパク質分解および硝酸還元活性に対する食塩およびアルギニンの影響

食塩存在下で、プロテアーゼ活性に及ぼすアルギニンの影響を検討するために、培地に混入したカゼインがプロテアーゼによって分解されて形成されるクリアゾーンの大きさを肉眼的に比較した。なお、今回は供試菌の生育を良くするために食塩濃度を5%とした。両供試菌ともに、食塩の添加でコロニーが小さくなり、これに伴ってクリアゾーンの大きさも小さくなる傾向が認められた。なお、アルギニンの添加によってクリアゾーンが大きくなる傾向はなかった。

供試菌の硝酸塩還元活性を経時的に亜硝酸根量を測定することで調査したが、今回用いた両菌株は、ともに最大で亜硝酸根が1 ppm以下であり、食塩あるいはアルギニン添加による硝酸塩の還元活性について分析することはできなかった。

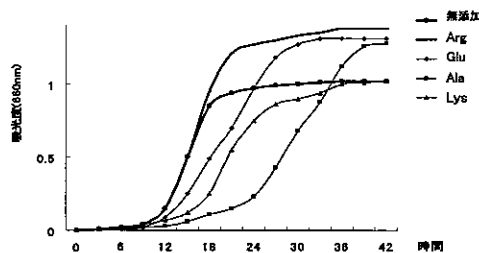


図2 *Sta. carnosus*の生育に対するアミノ酸関連物質の影響

MRS液体培地に食塩13%および各アミノ酸関連物質0.5%を添加し、前培養した*Sta. carnosus*を1ml接種し、振盪培養(37°C)を行った時の典型的な生育曲線

5) アミノ酸分析

食塩あるいはアルギニン添加の有無による供試菌の培養遠心上澄の遊離アミノ酸含量を分析し、その結果を表1に示した。

Sta. carnosus において、培養後のアルギニンの減少量は、無添加(培地のみ)で5.2 mg, 食塩添加で5.9 mg, 食塩およびアルギニン添加で15.9 mgであった。同様に *P. acidilactici* においては、アルギニンの減少量は、無添加で5.8 mg, 食塩添加で5.7 mg, 食塩およびアルギニン添加で、60.2 mgであった。また、両供試菌においてアルギニンの減少に伴い、オルニチンとグルタミンが増加する傾向が認められた。

両供試菌のアセトン乾燥菌体を加水分解しアミノ酸分析を行った結果を表2に示した。両供試菌ともに菌体へのアルギニンの蓄積は認められなかった。*Sta. carnosus* では食塩添加で菌体の総アミノ酸量(26.4 mg/乾燥菌体100 g)が無添加(23.6 mg)に比べて増加し、さらにアルギニンを添加すると27.4 mgとなった。一方、*P. acidilactici* では、これとは逆に無添加で21.6 mgであったものが、食塩およびアルギニンを添加すると約15 mgと、総量が減少した。

6) 走査型電子顕微鏡観察

供試菌の形態に対する食塩およびアルギニンの影響を走査型電子顕微鏡で観察し、その結果を図3に示した。両供試菌ともに食塩の添加によって菌体が膨化する様子が観察された。さらに *Sta. carnosus* では、莢膜様の構造が認められ個々の菌体は凝集する傾向が認められた。アルギニンの添加によって *Sta. carnosus* では、細胞表面の莢膜様の構造に細かい皺が観察されたが、*P. acidilactici* では、この膜様構造が見られず無添加と同様に滑沢な表面が観察された。

考 察

醗酵ソーセージ用スターターとして製品化されている市販品は、乳酸菌を中心に数種類の細菌を組み合わせているものが多い。各細菌は、固有の特性を有し、混合して使用することで相乗的な効果が期待されている。これらの中で、本実験に用いた *Sta. carnosus* と *P. acidilactici* は、今回、示したように比較的耐塩性が高く、生育も安定している。このためソーセージ内で乾燥後期まで優勢な細菌叢を保つものと考えられる。この両菌の、食塩耐性を調べると、*Sta. carnosus* では13%、*P. acidilactici* では8%まで典型的なシグモイド状の生育曲線を示した。一般に、スターターとして細菌に望まれる耐塩性は6%であるが、乾塩法などでは局所的に食塩濃度が高くなる可能性も容易に推定され、今回、行った高濃度の食塩と細菌の生育との関係を検討することも重要である。そこで、高濃度の食塩環境下にアルギニンを含むいくつかのアミノ酸関連物

質を加えて供試菌を培養しその効果を検討すると、アミノ酸関連物質は *Sta. carnosus* において誘導期を延長することを除き、両供試菌ともに最終的には定常期の濁度を上昇させ、特にアルギニンでは誘導期を延長することなく定常期の濁度も上昇させた。すなわち、今回用いたアミノ酸は高濃度の食塩存在下、阻害された生育を回復する作用を有し、特にアルギニンにおいて著しいことが明らかとなった。

乳酸菌は、乳酸醗酵に伴う乳酸の蓄積で環境 pH を低下させ、他の有害微生物などが生育し難い環境を作る。しかし、乳酸菌自身も、この pH の低下により生育が阻害される (SMITH and PALMBO, 1983; PEREZ *et al.*, 1992)。アルギニンは塩基性アミノ酸であり、アンモニアなどの代謝産物を含め環境 pH を上昇させる可能性が考えられるが、今回用いた供試菌においては食塩あるいはアルギニンの添加の有無に関わらずに培養後の pH を変化させることはなく、アルギニンの食塩による生育阻害の緩和効果は、環境(培地) pH の低下防止作用によるものではないことが推定された。これらの結果は液体培地の濁度によって供試菌の生育を推定したが、この上昇には死菌体や代謝産物の凝集・蓄積などの関与も考えられるので、培養後の生菌数の測定を行った。食塩のみを添加した培地における生菌数と比較して、アルギニン添加では、*Sta. carnosus* の生菌数が約4倍になり、*P. acidilactici* でも生菌数の増加が確認された。

供試菌におけるアルギニンの至適濃度を検討すると、アルギニンを0.5%添加したときに最も生育が良く、これ以上の添加による効果はなく、むしろ濁度を低下させた。そこで本実験ではアルギニンの添加量を0.5%とした。アミノ酸においてもいくつかのものは細菌の生育を阻害する。グリシンは、グラム陰性菌などに用量依存的に生育を阻害し、その作用はペプチドグリカンのアラニンと置換し構造を脆弱化させることにある (三浦・関川, 1979)。アルギニンにおいても添加量の増大に伴い浸透圧の上昇や代謝が為害的に作用し、細菌の生育を阻害するものと推定される。

醗酵ソーセージや食肉の呈味性向上に寄与するペプチドや遊離アミノ酸は (三上ら 1998; HIERRO *et al.*, 1999)、主に肉内在性の酸性プロテアーゼによって生成され (SEKIKAWA *et al.*, 1998)、乳酸菌はソーセージの pH を低下させることでタンパク質分解を促進する。また、一般に乳酸菌は細胞外にプロテアーゼを放出しないと考えられているが (MOLTEL *et al.*, 1992)、乳酸菌はアミノ酸の生合成能がないために窒素源としてタンパク質を効率的に利用する必要がある。このためのタンパク質分解系が菌体表層に存在し、このプロテアーゼやペプチダーゼが菌体周辺のタンパク質をペプチド、アミノ酸に分解し、これを体内に取り込んでいると考えられている (THOMAS and PRICHARD,

表1 培養上清の遊離アミノ酸含量

	<i>Sta. carnosus</i>			<i>P. acidilactici</i>		
	MRS	食塩	食塩+Arg	MRS	食塩	食塩+Arg
Hyp	0.9	0.7	0.7	3.5	2.3	2.0
Asp	2.5	1.7	2.0	12.5	6.3	6.0
Thr	10.5	7.1	7.7	9.8	11.8	13.6
Ser	5.9	1.0	1.7	12.7	9.0	7.2
Glu	19.7	17.7	23.3	18.5	24.1	29.0
Pro	1.7	1.3	1.5	2.7	2.1	1.9
Gly	1.9	0.0	0.0	5.4	5.3	5.2
Ala	9.8	8.7	9.5	16.0	14.2	14.2
Cys	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
Val	7.7	6.7	7.7	10.7	9.3	9.5
Met	2.3	1.9	2.6	0.7	1.0	1.5
Ile	3.8	2.9	3.7	6.8	5.4	5.7
Leu	11.3	8.8	11.8	18.3	14.8	15.5
Tyr	4.4	4.5	3.9	4.6	4.7	4.2
Phe	5.4	4.7	2.8	2.9	4.3	4.0
Orn	5.3	9.4	19.4	4.8	11.1	7.4
Lys	12.6	12.2	15.0	17.5	17.5	17.9
NH ₃	6.5	7.0	8.1	7.4	7.9	13.0
His	1.2	1.1	1.6	2.0	1.6	1.6
Arg	0.0	0.7	47.8	0.1	0.1	0.2
合計	113.6	98.4	171.2	157.5	153.1	160.0

(mg/100ml)

各培地(MRS: MRS 液体培地, 食塩: MRS に食塩添加, 食塩+Arg: MRS に食塩とアルギニンを添加) を用いて振盪培養後の培養上清中の遊離アミノ酸含量

表2 各培地で培養した菌体のアミノ酸組成

	<i>Sta. carnosus</i>			<i>P. acidilactici</i>		
	MRS	食塩	食塩+Arg	MRS	食塩	食塩+Arg
Hyp	0.7	0.6	0.6	1.2	0.8	0.7
Asp	2.4	2.0	1.9	1.6	1.2	1.2
Thr	1.0	1.0	1.1	0.9	0.7	0.7
Ser	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2
Glu	4.1	4.7	4.9	2.8	2.2	2.1
Pro	0.5	0.4	0.4	0.6	0.5	0.4
Gly	3.0	4.9	5.2	2.4	1.0	1.0
Ala	2.5	3.7	3.7	0.0	0.0	0.0
Cys	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Val	1.2	0.9	0.9	1.2	1.0	1.0
Met	0.4	0.2	0.2	0.5	0.0	0.1
Ile	1.4	1.7	1.8	2.0	1.4	1.4
Leu	1.0	1.2	1.2	1.6	1.3	1.3
Tyr	0.6	0.4	0.4	0.5	0.2	0.4
Phe	0.1	0.1	0.2	0.8	0.7	0.7
Lys	2.6	3.0	3.1	3.1	2.0	2.0
NH ₃	0.4	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4
His	0.4	0.3	0.3	0.6	0.6	0.5
Arg	0.9	0.7	0.7	1.0	0.8	0.8
合計	23.6	26.4	27.4	21.6	15.2	15.1

各培地(MRS: MRS 液体培地, 食塩: MRS に食塩添加, 食塩+Arg: MRS に食塩とアルギニンを添加) で振盪培養した菌体(アセトン乾燥)の加水分解物のアミノ酸組成 (mg/100mg)

1974; 中西, 1983; FLORES *et al.*, 1997). 今回, 用いた *Sta. carnosus* は *Micrococcus* 属の改良種で, タンパク質の分解力が強いとされているが(三浦, 1987), 高濃度の食塩とタンパク分解活性との関係は余り検討されていない. そこで, 菌体由来のプロテアーゼ活性を, カゼインを基質として加えた寒天平板培地上に形成されるクリアゾーンの大きさから定性的に分析した. その結果, 両供試菌ともに無添加の培地に明らかなクリアゾーンが観察されプロテアーゼの存在が確認された. 食塩を添加したものでは, 細菌のコロニーが無添加のものに比べて小さく, これに対応しクリアゾーンも小さかった. また, アルギニンも小さかった. また, アルギニンを添加してもクリアゾーンの大きさには, ほとんど変化がなかった. すなわち, アルギニンの添加は, 供試菌のプロテアーゼ活性に大きな影響を与えなかったものと考えられる.

培地に添加したアルギニンの消長を検討するために培養上澄の遊離アミノ酸含量を分析した. 両供試菌ともに, MRS 液体培地中のアルギニンは減少し, *Sta. carnosus* においては食塩添加によってほぼ枯渇した. 食塩およびアルギニンを添加すると, 無添加に比べて約3倍のアルギニンが消費された. なお, アルギニンの減少に伴いオルニチンが蓄積する傾向が認められた. *P. acidilactici* では, 食塩あるいはアルギニン添加の有無にかかわらずに培地中のアルギニンは, ほとんど枯渇した. しかし, *Sta. carnosus* とは異なり, アルギニンの減少に伴いオルニチンが蓄積する傾向は顕著ではなかった. オルニチンはアルギニンが脱アミノされて生じ, 多くの細菌にはアルギニンの代謝によってATPを生成するアルギニンディミナーゼ(ADI)系が存在する. 今回の結果から, 両供試菌にはADI系の存在が推定されるが, 最終的な代謝産物や経路には差があることが示唆された.

次に, 添加したアルギニンが菌体に蓄積されたかを確認するために, アセトン乾燥菌体を調製し, この加水分解物をアミノ酸分析に供した. 両供試菌ともに食塩あるいはアルギニンの添加の有無にかかわらずに菌体を構成するアミノ酸組成には大きな違いは認められず, 添加したアルギニンは菌体に, 直接, 取り込まれ構成アミノ酸として蓄積するのではなく, 何らかの代謝を受けていることが考えられた. *Sta. carnosus* では, 特にグリシンおよびアラニンが増加しているのに対して, *P. acidilactici* ではグリシンおよびリジンが減少し, 特にアラニンは消失してしまった. また, 乾燥菌体のアミノ酸総量は, *Sta. carnosus* では, 無添加, 食塩添加, 食塩+アルギニン添加の順に多くなっているのに対して, *P. acidilactici* では反対に少なくなる傾向が認められた. この傾向は, 走査型電子顕微鏡像において *Sta. carnosus* では高食塩濃度下, 菌体が膨化・凝集し, さらにアルギニン添加により, この傾向が著しくなり表層に皺を伴う膜様構造が認められたことと

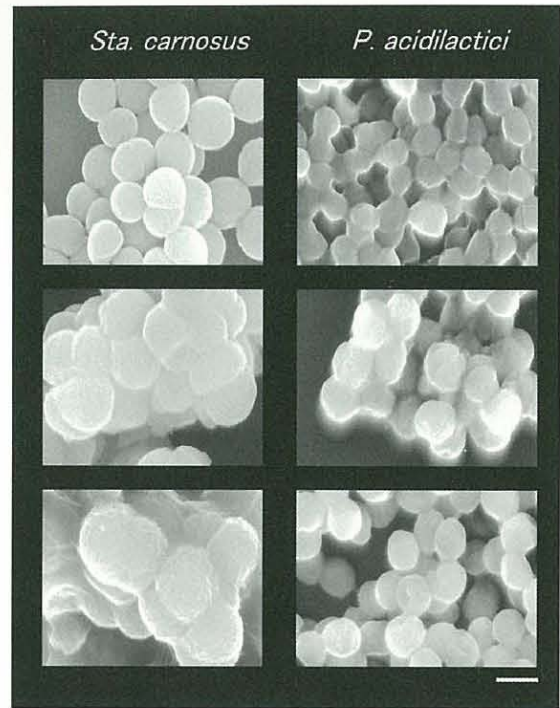


図3 供試菌の形態に及ぼす食塩およびアルギニンの影響

各培地(上段: MRS 液体培地, 中段: MRS に食塩添加, 下段: MRS に食塩とアルギニンを添加)で振盪培養した *Sta. carnosus* (左), *P. acidilactici* (右) のアセトン乾燥菌体の走査型電子顕微鏡像. 下端の白線は 1.0 μm を表す.

関連しているのかもしれない. すなわち, 食塩とアルギニン存在下で, 菌体を構成するアミノ酸量が重量当たり最も多かったことと一致し, 莢膜などの合成量が多かったものとも推察される. また, 菌体の凝集は, 莢膜などの細胞壁成分の増加により食塩などの浸透圧に対する直接的な防御反応なのかもしれない.

謝 辞

本研究の一部は, 文部科学省科学研究費(MS # 14656097), 「21世紀COEプログラム」補助金(A-1)および(財)三栄源食品化学研究振興財団研究助成金によって遂行された. ここに記して謝意を表す. また, 菌体の走査型電子顕微鏡の写真撮影にご協力を頂いた帯広畜産大学得字圭彦博士に深謝する.

参考文献

- HIERRO, E., L. D. HOZ and J. A. ORDONEZ (1999) Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 1156-1161.
- FLORES, J., J. R. MARCUS, P. J. NIETO, L. NAVARRO (1997) Effect of processing condition on proteolysis and taste of dry-cured sausages,

- Lebensm Unters Forsch, 204: 168-172.
- 三上正幸, 川島寿子, 関川三男 (1998) 細菌性スターターカルチャーを添加した非加熱醗酵ソーセージの微生物学および理化学的性状について. 日本畜産学会報, 69: 53-61.
- 三浦弘之 (1987) ミクロコッカス利用発酵ソーセージの特性. 酪農科学の研究, 36: 323-329.
- 三浦弘之, 関川三男 (1979) グラム陰性桿菌に対するグリシンの抑菌作用. 帯大研報, 11: 333-352.
- MONTEL M. C., R. TALON, M. CANTONNET, J. CAYROL (1992) Peptidase activities of starter cultures. Meat Science Technology, 38: 811-813.
- 中西武雄 (1983) 牛乳・乳製品の微生物学, 地球社, 19-338, 東京
- PEREZ, S. R., H. MIURA, M. MIKAMI, M. SEKIKAWA, (1992) Action of isolated *Micrococcus* sp., *Pediococcus* sp. and *Lactobacillus* sp. in fermented dry sausage. Research Bulletin Obihiro University, 17: 367-375
- SEKIKAWA M., K. SENO, M. MIKAMI (1998) Degradation of ubiquitin in beef during storage. Meat Science, 48: 201-204
- SMITH, J. L. and S. A. PALMBO (1983) Use of starter cultures in meat. J. Food Protect., 46: 997-1106
- THOMAS, T. D. and G. G. PRICHARD (1974) Localization of proteinase near the cell surface of *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol., 118: 329-333.
- 山本直之 (1996) 乳酸菌の科学と技術. 森地敏樹編, 111-132, 学会出版センター, 東京