

乳酸発酵によるカブ漬に関する試験

才1報：乳酸発酵によるカブ漬の製造段階における微生物および化学的変化

宮尾茂雄・青木睦夫

Studies on Fermented Turnips

Part I. Microbial and Chemical Changes of Fermented Turnips during Fermentation

Shigeo MIYAO and Mutsuo AOKI

Summary

Changes of sugar, acid and microorganisms in the liquid part of fermented turnips were investigated. The yield of lactic acid was higher when the turnips were fermented at 28–30°C for about a week after the preliminary pickling in which they were packed tightly into a jar with 3.0% salt and covered with a weight for pressing down at below 10°C for about a week.

The trend of microbiological and chemical changes during fermentation was similar to that of sauerkraut.

Although *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Micrococcus*, *Coryneform* bacteria, *Pseudomonas* and Enterobacteriaceae were found in the initial stage of fermentation, soon they became extinct.

Thereafter, *Lactobacillus plantarum* appeared to become a predominant florum and finally yeast increased gradually.

Lactic, acetic and succinic acid were produced, whereas malic acid was disappeared during fermentation.

緒 言

近年、消費者の漬物類に対する嗜好は、健康面における配慮もあると思われるが、低塩化された漬物類を好む傾向が顕著である。一方、酸味も好まれる方向にあり、ラッキョウ漬、柴漬風酢漬などの酢漬類が伸びている。これらの酸味の増加傾向は、現代人の味覚的な要求とともに、低塩化による漬物の保存性低下を、酸をふやし、pHを低く抑えることによって補うということからもきている。この酸を補う方法としては、酢酸・クエン酸・リンゴ酸などの有機酸を人工的に添加する方法があるが、長所としては製造が容易で、短時間に、大量に製造できることである。しかし、野菜独特の風味に欠け、人工的な味が出てしまう欠点がある。もう一方の方法は、酸味料を添加することなしに、自然の乳酸発酵を利用し、酸

の増加をはかる方法である。そこで、市場に多く出荷され、普及性も高いと思われるコカブを用いて、乳酸発酵による漬物の製造を試み、製造過程における微生物の挙動、および化学的諸変化について検討を加えたので報告する。

実験方法

1. 漬込方法

コカブに食塩を最終濃度3.0%になるように添加し、コカブ全重量の半量の差水を加え、一晩荒漬した後、水洗し、再び食塩を3.0%になるよう添加し、一試験区約7～10kgになるように、コカブをポリ容器に入れ、コカブと同重量の重石を置いた後、5, 10, 20°Cで本漬を行い、経目的に各本漬試験区よりコカブを適量採取し、28～30°Cで室漬を行った。発酵漬物の一連の製造については、

Fig.1に示した。

2. 有機酸の定量

0.02N 水酸化ナトリウム溶液で滴定し、本漬および室漬中における酸の変化を調べ、乳酸として算出した。室漬における各種有機酸の変化については、山下ら¹⁾の方針に準拠し、有機酸類をブチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーによって行った。

3. 糖の定量

ソモギー変法により定量した。

4. 生菌数の計数

一般細菌数は、標準寒天培地で30°C 3日間培養後、乳酸菌数は0.12%のソルビン酸カリウムを添加したB.C.P. 加ブドウ糖寒天培地で、30°C 3日間培養後、グラム陰性細菌数は、C.V.T.寒天培地にて、25°C、3日間培養後、それぞれ計数した。

5. 細菌の分離および同定

各試験区の漬液より標準寒天培地を用いて、塗抹法により細菌を分離し、20~30個の集落の出現した標準寒天培地上より、全細菌を釣菌し、純粹培養後、集落の形態、グラム染色性、検鏡結果(形態、運動性、芽胞の存在の有無)から、約280株に整理し、その後、OFテスト、カタラーゼ、オキシダーゼテストを実施し、さらに大まかな群にわけた後、それらの代表的な菌株については、

既報²⁾に準じて同定した。

6. 分離菌株の耐塩性

供試菌株は、あらかじめ、基礎培地(トリプチケースペプトン0.5%、酵母エキス0.25%、ブドウ糖0.1%、pH6.0)を用いて2日間30°Cで前培養した。一方、耐塩性をみるために、食塩を、それぞれの濃度が0, 2, 4, 6, 8%になるように、基礎培地に添加し、中試験管に、それぞれ10mLずつ分注し、滅菌した。次に、前培養によって得た菌液を、均一になるよう良く振とうした後、上記各培地に、無菌的に、それぞれ0.1mLずつ接種し、30°Cで48時間培養した。そして、分光光度計で、波長660nmにおける吸光度を測定し、対照における吸光度と、食塩含有培養液における吸光度との比から耐塩性を表現した。

7. 分離菌株のpH耐性

6と同様の培地にて、2日間30°Cで前培養した後、その菌液を、pHをそれぞれ4.2, 4.4, 4.6, 5.0, 5.5に調整した培養液(10mL)に、無菌的に、それぞれ約0.03mLずつ接種し、30°Cで培養した。その際、7日間経過後も、増殖が認められなかったものを(-), 2~7日目の間に増殖が認められたものを(+), 1~2日目の間に増殖の認められたものを(++)、1日以内に増殖が認められたものを(++)で表現した。

実験結果

1. 本漬条件の検討

サワークラウトの原料野菜であるキャベツなどと異なり、コカブにおいては、糖の浸出に時間を要するので、適度な乳酸量を得るためにには、コカブから漬液への糖の浸出工程(本漬)が必要である。そこで、コカブを、5, 10, 20°Cにて本漬し、経目的に、漬液中の糖濃度、酸濃度への変化を調べたが、その結果をFig.2に示した。20°Cの本漬では、2日後に糖濃度が0.34%に達した後は急激に減少し、以後増加しなかったが、一方、酸は2日目以降から上昇し、6日目に0.33%に達した後、減少し。これは、20°Cでは、糖の浸出速度は、低温下における場合よりも速いが、一方、微生物の増殖も盛んであるため、糖の浸出速度よりも微生物による糖の消費の方が上回ったために、糖の蓄積が起こらなかったものと考えられる。10°Cでは、糖濃度は、6日目に0.45%に達した後、急激に減少した。酸濃度は、出発時0.06%であったが、9日目においても0.15%に達したに過ぎなかった。これは20°Cでは乳酸菌の増殖が盛んであったが、10°Cにおいては、増殖が抑制されたためと思われる。5°Cでは、微生物の増殖、活動はさらに抑制されたために、糖濃度

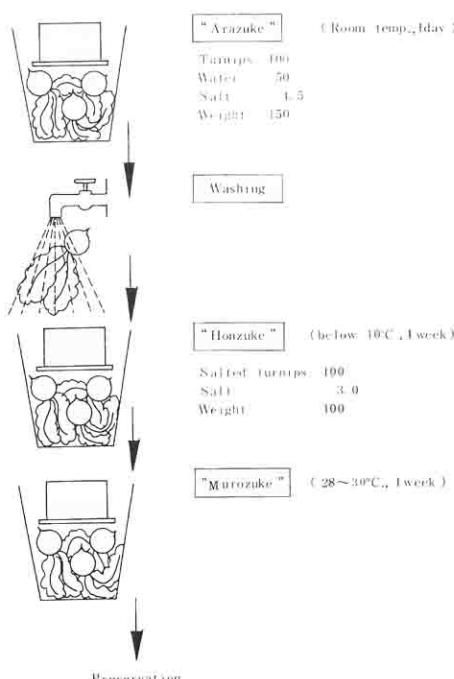


Fig.1. Making process of fermented turnips

は、ほぼ直線的に増加し、6日目では、10°Cとほぼ同濃度の0.46%，10日目には、0.62%に達した。以上の結果から、室漬における発酵の前工程としての本漬は、低温下で行なうことが望ましいことがわかった。そこで、つぎに、10°Cで本漬を実施したコカブを用いて、本漬開始後から、1日を追って、室漬を28~30°Cで行い、異なる期間で本漬したコカブの室漬中における生酸変化について調べたが、その結果をFig.3に示した。2日間本漬したコカブを室漬した場合は、室漬開始後4~5日目で、酸濃度は0.61%と最高に達し、以後減少した。6日間本漬したコカブを室漬した場合は、室漬開始後、約7日目で0.94%に達した。しかし、2日間本漬した場合と異なり、酸の減少は非常に緩慢となり、10日目においても、0.91%にとどまった。また、9日間本漬したコカブを室漬した場合は、6日目に0.80%に達した後、減少した。以上から、室漬によって高い酸量を得るには、適当な期間本漬する必要があり、本漬期間が短か過ぎても、長すぎても、低い酸量にとどまることがわかった。したがって、コカブの本漬は、10°C以下で約1週間行い、その後、室漬を約1週間行った後、製品とする場合に、最も高い酸

濃度を有する発酵カブ漬を得られることがわかった。

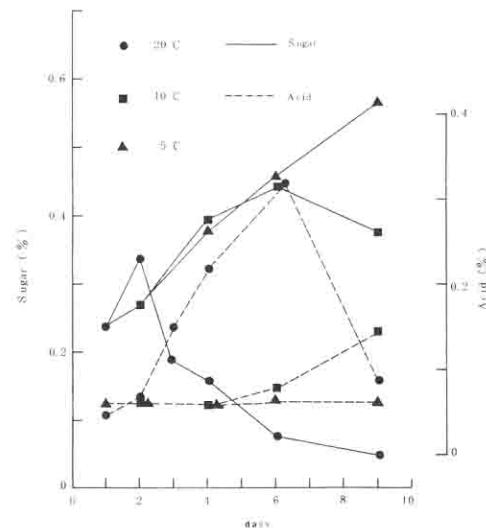


Fig. 2. Changes of sugar and acid in liquid part of fermented turnips during 'Honzuke' (step of pickling) at various temperatures

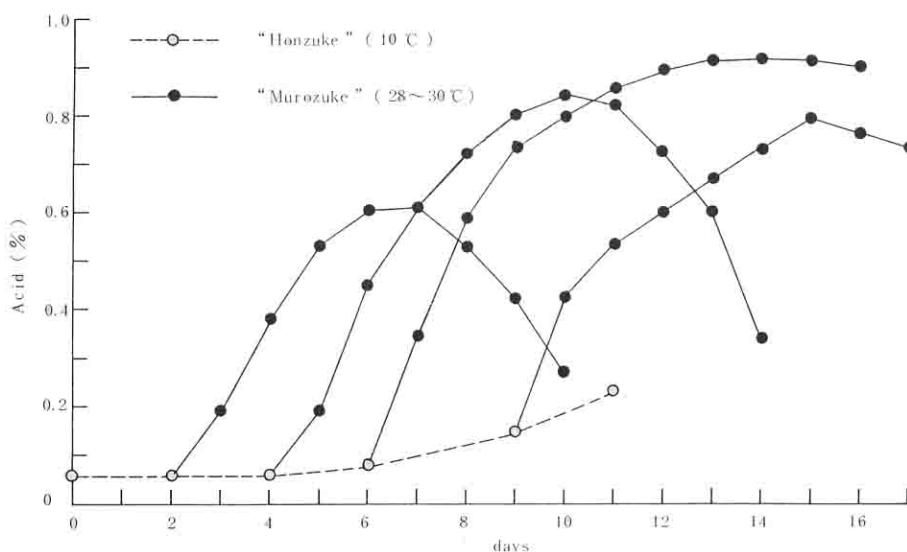


Fig. 3. Changes of acid in liquid part of fermented turnips during "Honzuke" (step of pickling) at 10°C and "Murozuke" (step of fermentation) at 28~30°C

2. 室漬中の微生物の量的変化

10°C 6日間本漬したコカブの室漬中における微生物の量的変化およびpHの変化をFig.4に示した。室漬開始時 $2.4 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 存在していた球状乳酸菌が適正温度下にお

いて急激に増加し、1日後には、 $3.8 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ に達し、それにもとまらず乳酸の生成によりpHは低下し始め、原料カブに多く付着していたグラム陰性細菌は、減少した。2日目からは、桿状乳酸菌が増加し始め、3日目には、

$10^8/ml$ を超える菌量に達し、pHはさらに低下し、6日目にpH3.25になった。この桿状乳酸菌の急激なpH低下作用により、低pHに弱い球状乳酸菌は減少し、グラム陰性細菌は、4日目には死滅した。一方、酵母は、室漬開始時においては、 $7.8 \times 10^2/ml$ であったが、pHが低下した2日目以降から急激に増加し、6日目には、 $10^8/ml$ に達した。

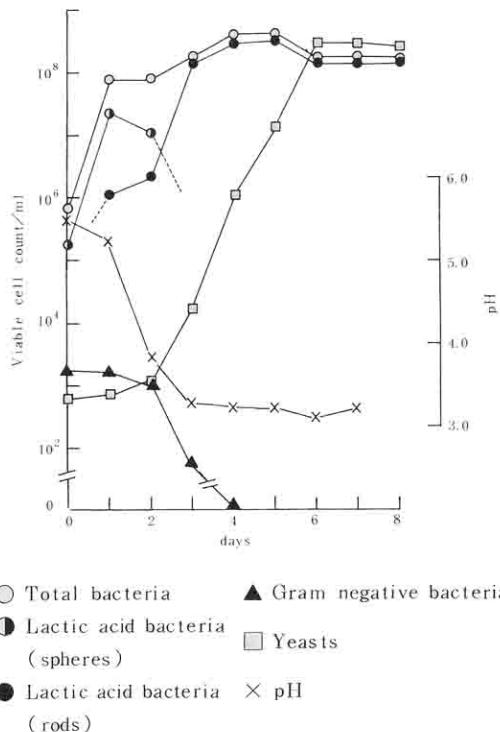


Fig. 4. Changes of viable microorganisms and pH during "Murozuke" (step of fermentation) of turnips.

3. 室漬中の微生物叢変化

室漬の経過にしたがって漬液より分離した細菌の同定を試みたところ、Fig.5に示すように、室漬初期（0～2日目）に分離された微生物の多くは球状乳酸菌で、その他に、*Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, 少数菌として、コリニ型菌、*Erwinia* が分離された。室漬中期（3～5日目）になると、球状乳酸菌は減少し、桿状乳酸菌が優勢菌種となり、少数の酵母が分離され始め、以後、増加した。室漬後期（6～8日目）になると、微生物叢は比較的安定し、桿状乳酸菌以外の細菌はほとんど死滅し、桿状乳酸菌と酵母から成る単純な構成となった。つぎに、分離された代表的な菌株につ

いて、形態、グラム染色性、生化学的性状について調べさらに詳しく同定したところ、球状乳酸菌としては、*Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus* と同定された。また桿状乳酸菌のほとんどは、*Lactobacillus plantarum* であった。それら乳酸菌の性状については、Table 1に示した。また、乳酸菌以外の細菌について同定したところ、その代表的な菌株の多くは、*Micrococcus varians*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Coryneform bacteria* などで、*Enterobacteriaceae* としては、*Erwinia* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus* sp. などと同定された。なおそれらの菌株の性状については、Table 2, Table 3に示した。

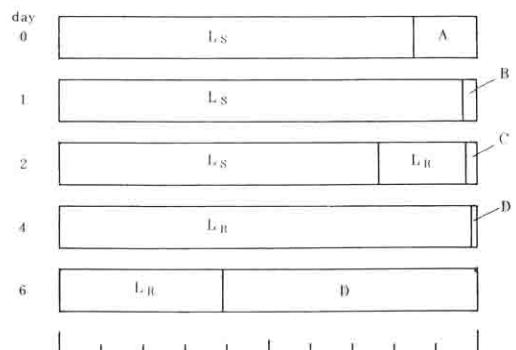


Fig. 5. Changes of microbial flora during "Murozuke" (step of fermentation) of turnips.

4. 分離菌株の耐塩性

荒漬、本漬開始時においては、食塩を散布する関係上コカブから水分が浸出してくる段階において、一時的に高濃度の食塩環境下におかれるので、微生物の耐塩性の差異により、淘汰されることが予想される。そこで、分離した代表的な菌株を用いて、それらの耐塩性について調べたところ、Fig.6で示す結果を得た。*Coryneform bacteria*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* は、食塩濃度が4.0%では、ほとんど増殖できなくなり、6.0%では、増殖できなかった。一方、*Micrococcus va-*

riani, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*は、食塩濃度が8.0%においても生育可能で、食塩に対する耐性を示した。

食塩濃度が、ある一定の濃度に達している室漬においては、微生物叢の変化の主要因はpHの低下である。そこで、耐塩性と同様に、分離菌株のpH耐性について調べた

Table 1. Characteristics of isolated bacteria.

Lactic acid bacteria

	L 3	L 1	L 2	L 4
Gram	+	+	+	+
Cell	S	S	S	R
Motility	—	—	—	—
Catalase	—	—	—	—
Oxidase	—	—	—	—
OF	F	F	F	F
Growth at				
15°	+	+	+	+
37°	—	+	+	+
45°	—	+	—	—
Survive 60°/30min	—	+	+	+
Growth at pH				
4.4	+	+	+	•
8.6	+	+	—	
9.6	—	+	—	•
Growth in NaCl				
6.5%	—	+	+	+
10%	—	—	—	•
Slime formation	+	—	—	—
NH ₃ from Arginine	•	+	+	+
Esculin hydrolysis	—	+	+	+
Lactic acid	D(-)	DL	DL	DL
Final pH	4.3	3.8	4.0	3.8
Acid from Ara	+	+	+	—
Glu	+	+	+	+
Lac	+	+	—	—
Mal	+	+	+	+
Mnt	+	+	—	•
Raf	+	—	—	+
Rha	—	—	—	•
Sal	+	—	+	+
Sor	—	—	+	+
Suc	+	+	+	+
Xyl	+	+	+	—
Gas from Glu	+	—	+	+

L 3 *Leuconostoc mesenteroides*L 1 *Streptococcus faecium*L 2 *Pediococcus pentosaceus*L 4 *Lactobacillus plantarum*

のがTable 4である。室漬初期から中期にかけて減少、死滅した細菌は、はじめにCoryneform bacteria, *Pseudomonas*, *Micrococcus*で、つぎにEnterobacteriaceaeに属する細菌であったが、これらの順序と同様なpH耐性に関する強弱の差異がみられ、Coryneform bacteriaはpH5.0の培養液中では、1週間以内では生育は認められず *Pseudomonas*, *Micrococcus*は、pH4.6では生育できたがpH4.4で生育できなかった。しかし、*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*は、pH4.4でも生育可能

Table 2. Microbial characteristics of isolated strains

Microbial characters	Strains			
	A 1	A 2	A 22	P 23
Gram reaction	+	—	+	—
Cell	s	r	r	r
Spore	—	—	—	—
Motility	—	+	—	+
Flagella	—	+	—	+
Pigment	+	—	+	—
Fluorescent pigment	—	+	—	—
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	—	+	—	+
Decomposition of				
gelatin	+	+	+	—
starch	—	—	—	—
esculin	/	—	+	+
arginine	—	+	—	—
Growth in				
MacConkey media	/	+	/	+
SS media	/	+	/	—
KCN media	/	—	/	—
media at 42°C	/	—	/	—
V.P. reaction	—	—	—	—
Assimilation of citric acid	/	+	—	+
Indole	/	—	/	—
Nitrite from nitrate	+	+	+	+
Acid from carbohydrate				
Arabinose	—	+	+	+
Lactose	+	—	—	—
Maltose	+	—	+	—
Mannitol	+	—	+	—
Salicin	+	—	+	—
Sorbitol	+	—	—	—
Sucrose	+	—	+	+
Xylose	—	—	+	+
Glucose : oxidative	+	+	+	+
: fermentative	—	—	—	—

A 1: *Micrococcus varians*A 2: *Pseudomonas fluorescens*

A 22: Coryneform bacteria

P 23: *Pseudomonas* sp.

Table 3. Microbial characteristics of isolated strains
(Enterobacteriaceae)

Microbial characters	P 4	P 5	P 6	P 7	P 10	P 16	P 19
Gram reaction	—	—	—	—	—	—	—
Gel	r	r	r	r	r	r	r
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Yellow pigment	+	—	+	—	—	—	—
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	—	—	—	—	—	—	—
Decomposition of							
gelatin	—	—	—	—	—	+	—
esculin	+	—	—	+	—	+	—
arginine	—	—	—	—	—	+	—
Lysine decarboxylase	—	—	—	+	—	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—	—	+	—	+	+
Growth in KCN media	—	+	—	+	+	+	+
V.P. reaction	+	—	+	+	—	+	—
Assimilation of citric acid	+	+	+	+	—	+	—
M.R. reaction	—	—	—	—	—	—	—
Indole	—	—	—	—	+	—	+
Gas production (glucose)	+	+	—	+	—	+	+
I.P.A. production	—	—	—	—	+	—	+
H ₂ S production (TS media)	—	—	—	—	—	—	—
Nitrite from nitrate	+	+	+	+	+	+	+
Acid from carbohydrate							
Arabinose	+	+	+	+	—	+	+
Glycerol	+	+	—	+	+	+	+
Lactose	+	—	+	+	+	+	—
Mannitol	+	+	+	+	+	+	—
Raffinose	+	—	—	+	—	+	—
Rhamnose	+	+	+	+	—	+	—
Salicin	+	—	—	+	+	+	—
Sorbitol	+	—	—	+	—	—	—
Sucrose	+	—	+	+	—	+	—
Xylose	+	—	+	+	—	+	—

P 4 : *Erwinia* sp.P 5 : *Hafnia alvei*P 6 : *Erwinia* sp.P 7 : *Enterobacter aerogenes* P 10 : *Proteus* sp.P 16 : *Enterobacter aerogenes*P 19 : *Enterobacter cloacae*

で、pH4.2以下になって生育できなくなった。したがって室漬の微生物叢変化において、Enterobacteriaceaeに属する菌種が長く生存し得たのは、この高い耐塩性とpH耐性に帰因するものと考えられた。

5. 室漬中の各種有機酸の消長

室漬中の各種有機酸の消長をFig.7に示した。室漬開始時において、乳酸、コハク酸、酢酸は、それぞれ20mg/100g, 7.5mg/100g, 4.0mg/100gであったが、室漬の進行とともに、それぞれ増加し、2日目以降からは急激に増加した。そして6日目には、それぞれ 1120mg

/100g, 16.0mg/100g, 38.5mg/100gに達した。これらは、いずれも、微生物、特に乳酸菌の増殖および活動の結果と考えられる。一方、室漬開始時に、13.0mg/100g存在していたリソゴ酸は、3日目にこん跡程度となり、4日目以降は検出されなくなったが、これは、微生物に利用されたものと考えられた。

考 察

発酵漬物を製造するにあたっては、原料野菜の特徴に適した発酵管理技術が必要と思われる。サワークラウト

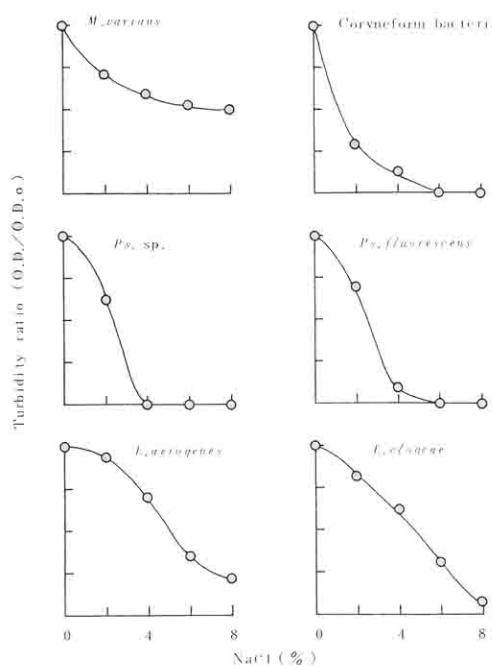


Fig. 6. Salt tolerance of bacteria.

Bacteria were cultivated in media (0.5% peptone, 0.25% Yeast extract, 0.1% glucose, pH 6.0) containing certain amounts of NaCl at 30°C for 48 hrs.
($O.D.o = O.D.$ at 0% NaCl after 48 hrs.)

Table 4. Effect of pH on the growth of various bacteria isolated from turnip or fermented turnip

Bacteria	Growth (pH)				
	4.2	4.4	4.6	5.0	5.5
<i>Coryneform bacteria</i>	—	—	—	—	—
<i>Micrococcus varians</i>	—	—	+	++	++
<i>Acinetobacter</i> sp.	—	—	—	++	++
<i>Proteus</i> sp.	—	—	—	++	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	—	—	++	++	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	—	++	++	++	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	—	++	++	++	++

The cultivation was carried out in PYG media at indicated pH at 30°C. Symbols indicate no growth within 7 days (—), growth within 7 days (+), 2 days (++) 1 day (+++).

は、キャベツを原料とし、それを細切り、約2%の食塩で漬けた発酵漬物であるが、細切され、しかも強く重石

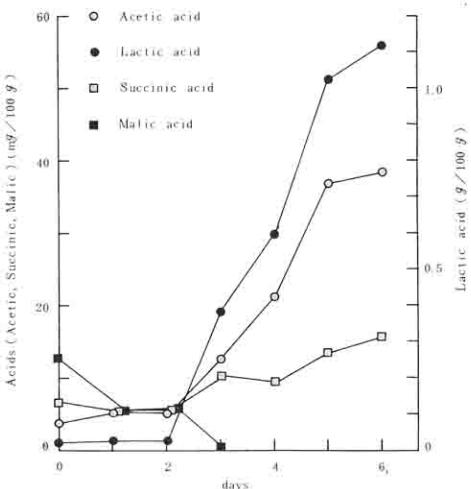


Fig. 7. Changes in the amount of organic acids during "Murozuke" (step of fermentation) of turnips.

されるので漬液中の糖の浸出が急速で、乳酸菌の活動も活発となり、約28°Cの発酵温度で充分な量の乳酸が生成される。このように、葉菜類で、糖含量も充分にあるキャベツのような原料を素材にして発酵漬物を製造する場合は、それ程の発酵管理を必要としない。しかし、本報告で述べたような根菜類の場合は、乳酸の原料ともいえる糖を充分に漬液中に浸出させる必要がある。なお、本実験の結果で明らかにしたように低温下で約1週間本漬を行ったものを室漬にしたもののが良質の発酵漬物ができたが、本漬期間を短期間あるいは長期間行った場合には、酸濃度の低い発酵漬物になった。これらの原因については以下のように考えられる。すなわち、本漬が短期間の場合、糖の浸出が充分でないうちに、つぎの室漬(発酵工程)に移行するために、乳酸の生成が不充分の状態のまま、酵母の増殖が活発となり、その結果、酵母による乳酸の消費が進行し、充分な酸量を得ることができなかったためと推定される。一方、本漬が長期間となった場合は、本漬における糖の浸出は充分であるが、乳酸菌が増殖困難な低温下でも、低温細菌の増殖が進行したため、本漬期間内においても糖の消費が始まり、さらに室漬に移行した初期では、乳酸菌よりも、それらの低温細菌が一時的に活発となるので、乳酸菌が活動する前に糖の減少が生じ、それが原因となって、充分な酸量を得ることができなかったものと推定される。したがって、春や秋口などの割合暖かい時期に自然発酵させた場合、失敗すること(乳酸量が充分に上がらない)が多いのは、

糖含量の少ない材料を使用したためか、あるいは、低温下での本漬を行わないで発酵させたため、雑菌により糖が消費され、乳酸生成量も少なくなったことによるものと考えられる。したがって、恒常に良質な発酵漬物を製造していくには、有用乳酸菌および芳香を付与する酵母など、発酵漬物に有用な微生物をうまく活用するとともに、原料に付着してくる雑菌の増殖、活動を抑制するなどして、うまくコントロールし、原料野菜に含まれる糖を有効的に乳酸発酵させる必要があると思われる。その目的のためには、材料野菜の形状、糖含量などに基づいた適切な選択が必要で、雑菌の汚染が高ければ、充分に洗浄することが重要であると思われる。また、食塩濃度を一定に保つと同時に、均一に原料中に分散されることも望ましい。さらに、重石重量、低温下における糖の浸出期間、発酵温度、発酵期間は、特に品質に影響をおよぼすと考えられるので、適切な管理が必要であると思われる。

摘要

乳酸発酵によるコカブの製造を試み、本漬、室漬の条件を検討したところ、10°C以下で約1週間本漬した後、28~30°Cで室漬を約1週間行ったものが、酸濃度も高く良好であった。室漬中の微生物変化はサワークラウト³⁾

^{~5)}などと同様に、初期には、球状乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*)、コリネ型菌, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* が主に分離され、中期以降は、桿状乳酸菌の *Lactobacillus plantarum* と酵母がほぼ同数分離されるようになった。また室漬中の有機酸変化について調べたところ、乳酸、酢酸、コハク酸が増加し、リンゴ酸は減少し、消失した。

文献

- 1) 山下市二・田村太郎・吉川誠次・高波修一：
農化, 48, 165 (1974)
- 2) 宮尾茂雄・青木睦夫：
食品工誌, 25, 327 (1978)
- 3) PEDERSON C. S. : New York State Agric. Exp. Sta. Tech., No. 168 (1930)
- 4) PEDERSON C. S. and WARD L. :
New York State Agric. Exp. Sta. Tech. Bull., No. 288 (1949)
- 5) PEDERSON C. S. and ALBURY . N. :
New York State Agric. Exp. Sta. Tech. Bull., No. 744 (1950)