

## 乳酸発酵によるカブ漬に関する試験 第2報：乳酸発酵によるカブ漬の保存中における 微生物および化学的変化

青木睦夫・宮尾茂雄

Studies on Fermented Turnips

Part II. Microbial and Chemical Changes of Fermented Turnips  
during Preservation

Mutsuo AOKI and Shigeo MIYAO

### Summary

Development of organic acids and changes in bacterial flora in fermented turnips during preservation at 5–30°C were investigated to obtain the following results.

- 1) The composition of organic acids in the liquid part of fermented turnips were mainly acetic, lactic and succinic acid at the early stage of preservation. And lactic acid, succinic acid decreased, whereas acetic acid increased during preservation. Furthermore, formic acid and butyric acid were newly detected and a strong smell produced.
- 2) The shelf-life of fermented turnips was less than 10 days at 20 and 30°C, 10 days at 10°C and 100 days at 5°C storage temperature.
- 3) Though the lactic acid bacteria and Yeasts were predominant on the early stage of preservation, Enterobacteriaceae, Coryne-form bacteria, *Alcaligenes* and *Bacillus* increased with rise of pH by the consumption of lactic acid by the yeast and putrefaction took place at the end of preservation.

前報において<sup>1)</sup>、乳酸発酵したカブ漬の製法と期間中の成分、微生物叢の変化を検討したが、本報では保存期間中の有機酸、微生物叢変化について調べ品質保存限界を検討した。また、保存中に刺激性のある悪臭が発生したので、これらの原因究明を行い、若干の知見を得たので報告する。

### 実験方法

1. 保存方法 発酵が完了したカブ3kg、漬液1.9ℓをポリ樽に詰め、押した、重石1.5kgをし、上部をビニール膜で簡単に被覆した。
2. 保存温度 5, 10, 20, 30 インキュベーター中に保存した。
3. 有機酸の定量 前報のように行なった。<sup>1)</sup>

4. pHの測定 前報のように行なった。

5. 生菌数の計数、細菌の分離、同定

前報に準拠して行なった。なお各保存区からの試料採取に当っては、予備試験より漬液上部から、腐敗が進行することがわかったので、表面下約3~5cmのところから採取した。

6. pH上昇要因の解明 酵母として *Debaryomyces* sp. 細菌として *Enterobacter aerogenes* および、 *Citrobacter freundii* をペプトン0.5%，酵母エキス0.25% 液に培養して行なった。

7. 有機酸の生成と微生物 8種類の菌株をブドウ糖培地（ブドウ糖0.5%，ペプトン0.5%，酵母エキス0.25% 液）、乳酸培地（ペプトン0.5%，酵母エキス0.25% 液）を乳酸でpH5に調整300mℓに接種し、28°C、6日間培養し、雑菌の汚染がないことを確認してから、

Table 1. Changes of organic acids in the liquid part of fermented turnips during preservation at 5 °C

	Days						
	10	30	60	90	100	110	120
Acetic acid	4.2	3.5	3.0	3.0	1.8	1.6	1.2
Butyric acid	—	—	—	—	—	—	Trace
Lactic acid	11.01	10.95	10.86	10.86	9.83	7.20	3.85
Succinic acid	1.7	1.4	1.3	1.3	0.8	0.6	0.4
Total acid	11.60	11.44	11.29	11.29	10.09	7.42	4.01

(mg/100g)

培養液を遠沈し、上澄液を1/10N水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性とし、20mLに減圧濃縮した。さらに、この液に1N塩酸を加え酸性とし、エーテル抽出した後、前報<sup>1)</sup>に従って有機酸の定量を行った。同定は各種有機酸を基準物とし、リティーション、タイムから行った。

## 結果

1. 保存期間中の有機酸変化 カブ漬の総酸量は約1.2%あり、組成としてはTable 1のように乳酸、酢酸、コハク酸であった。これを5°Cに保存した場合の変化は、保存日数の経過とともに各有机酸とも減少した。総酸量は110日目に1%以下に減少した。pHの変化は120日目にpH 5に達し、カブは黒変しやや刺激性のある悪臭が発生し酢酸が検出された。10°Cに保存した場合では、Table 2のように保存日数40日目にギ酸、酢酸が検出された。

Table 2. Changes of organic acids in the liquid part of fermented turnips during preservation at 10 °C

	Days				
	10	20	30	40	50
Formic acid	—	—	—	1	1
Acetic acid	20	20	17	17	30
Butyric acid	—	—	—	1	1
Lactic acid	11.09	6.71	4.86	3.14	2.81
Succinic acid	1.3	1.3	1.0	0.8	0.8
Total acid	11.42	7.04	5.13	3.41	3.21

(mg/100g)

酢酸は30~40日にかけて若干減少したが、50日目に再び増加し、乳酸、コハク酸は減少した。総酸量は20日に1%以下に減少した。pHの変化は40日目にpH 5に

達し、カブは黒変しやや刺激性のある悪臭が発生した。20°Cに保存した場合では、Table 3のように保存日数40日目にギ酸、30日目に酢酸が検出された。酢酸は増加し続け、乳酸は減少したが、コハク酸は一定傾向を示さなかった。

総酸量は10日目に1%以下に減少した。pHの変化は30日目にpH 5以上に達し、カブは黒変し強い刺激性の

Table 3. Changes of organic acids in the liquid part of fermented turnips during preservation at 20 °C

	Days			
	10	20	30	40
Formic acid	—	—	—	8
Acetic acid	21	24	64	68
Butyric acid	—	—	4	2
Lactic acid	8.76	7.61	3.95	1.71
Succinic acid	5	7	9	6
Total acid	9.02	7.92	4.72	2.55

(mg/100g)

Table 4. Changes of organic acids in the liquid part of fermented turnips during preservation at 30 °C

	10	20	30
Formic acid	—	1	1
Acetic acid	2.2	5.4	5.8
Butyric acid	—	4.0	7.9
Lactic acid	7.68	2.33	1.27
Succinic acid	7	4	1
Total acid	7.97	3.32	2.66

(mg/100g)

ある悪臭が発生した。30°Cに保存した場合では、Table 4のように保存日数20日目にギ酸、酪酸が検出された。酢酸は増加し続け、乳酸、コハク酸は減少した。総酸量は20°C区と同様に10日目に1%以下に減少した。pHの変化は20日目にpH 5以上に達し、カブは黒変し非常に強い刺激性のある悪臭が発生した。

## 2. 細菌の同定および微生物叢の変化

保存中から腐敗に至るまでの間の漬液より分離した細菌について同定したところ、乳酸菌の多くは、Table 5

に示した形態、生理的性状から *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus brevis* であった。また、保存中の上昇により腐敗が進行したが、その腐敗時における細菌を分離しTable 6から Enterobacteriaceae では、*Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* と同定した。その他の細菌は同様に Table 7から、*Bacillus subtilis*, *Coryneform bacteria*, *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas sp* と同定した。

5~30°Cに保存した場合の細菌群の変化をFig.1~4

Table 5. Characteristics of isolated bacteria.

### Lactic acid bacteria

during	storage	
	SL1	SL2
Gram	+	+
Cell	R	R
Motility	-	-
Catalase	-	-
Oxidase	-	-
O 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 <sub>3</sub> from Arginine	-	+
Esculin hydrolysis	+	+
Lactic acid	DL	DL
Final pH	3.8	4.1
Acid from Ara	+	+
Glu	+	+
Lac	-	+
Mal	+	+
Mnt	•	•
Raf	+	-
Rha	•	•
Sal	+	-
Sor	+	-
Suc	+	-
Xyl	-	+
Gas from Glu	-	+

SL1 *Lactobacillus plantarum*

SL2 *Lactobacillus brevis*

Table 6. Characteristics of isolated bacteria

### Enterobacteriaceae

during	storage	
	SP11	SP16
Gram	-	-
Cell	R	R
Motility	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	-
O.F.	F	F
Yellow pigment	-	-
Nitrate reduction	+	+
H <sub>2</sub> S(TSI)	+	-
I.P.A.	-	-
V.P.	-	+
Gas (Glu)	+	+
Growth (KCN)	+	+
Citrate	+	+
M.R.	-	-
Indole	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-
Arginine hyd	+	-
Esculin hyd	-	+
Lysine decarboxylase	-	+
Ornithine decarbo	-	+
Acid from Ara	+	+
Gly	+	+
Lac	+	+
Mal	+	+
Mnt	+	+
Raf	+	+
Rha	+	+
Sal	+	+
Sor	+	+
Suc	+	+
Xyl	+	+

SP11 *Citrobacter freundii*

SP16 *Enterobacter aerogenes*

に示した。各区とも乳酸菌、酵母数は保存日数の経過に従がい徐々に減少し、一方、酵母の乳酸消費によると思われるPHの上昇にともなって、グラム陰性菌が増加した。Fig.5に各温度で保存した場合の細菌叢の変化を示したが、5~20℃では腐敗を呈する頃には、主にEnterobacteriaceaeに属する細菌が増加した。30℃では高温のため変化が著しく、20℃以下と異なり腐敗時において、コリネ型菌、*Alcaligenes* *Bacillus*が増加した。

Table 7. Characteristics of isolated bacteria

during	storage			
	SA6	SA22	SP3	SP21
Gram	+	+	-	-
Gell	R	R	R	R
Spore	+	-	-	-
Motility	-	-	+	+
Flagellation	•	•		
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+
O/F	0	+	-	0
Pigment	-	+	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	-
V.P.	+	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	•	+
Gelatin hyd.	+	+	-	+
Starch hyd.	+	-	•	-
Esculin hyd.	+	-	-	-
Citrate	+	-	+	+
Growth on MacConkey on SS	•	•	+	+
Fluorescent	•	•	•	+
KCN	•	•	+	-
Indole	•	•	-	-
Growth at 42℃	•	•	•	-
Acid from Ara	+	-	-	+
Lac	-	-	-	-
Mal	+	-	-	-
Mnt	+	-	-	-
Sal	+	-	-	-
Sor	+	-	-	-
Suc	+	-	-	-
Xyl	+	-	-	+

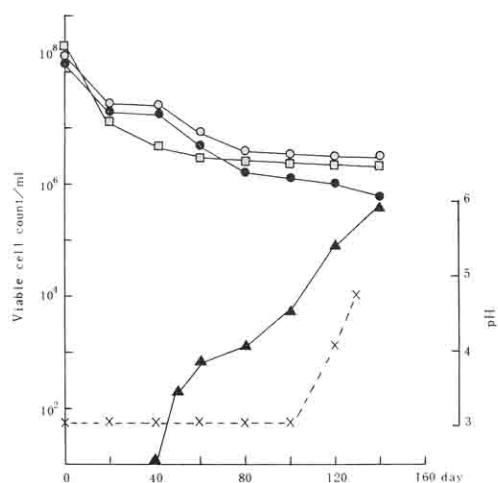
SA6 *Bacillus*SA22 *Coryneform*SP3 *Alcaligenes* sp.SP21 *Pseudomonas* sp.

Fig.1. Changes of microbial flora and pH during preservation of fermented turnip at 5℃

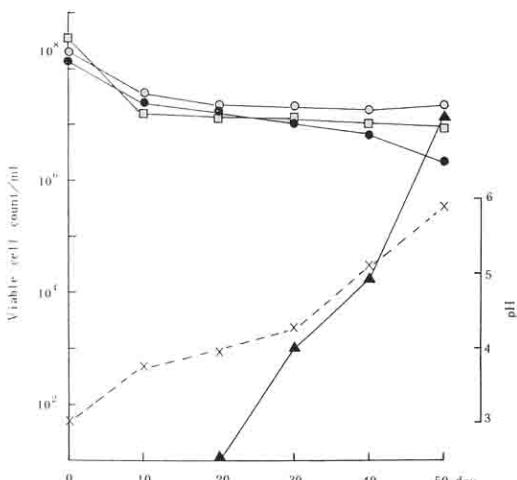
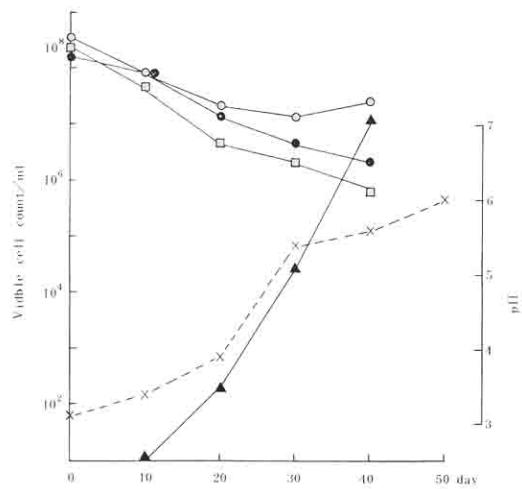
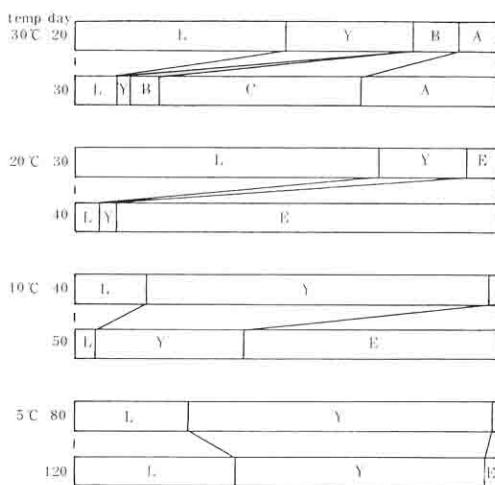


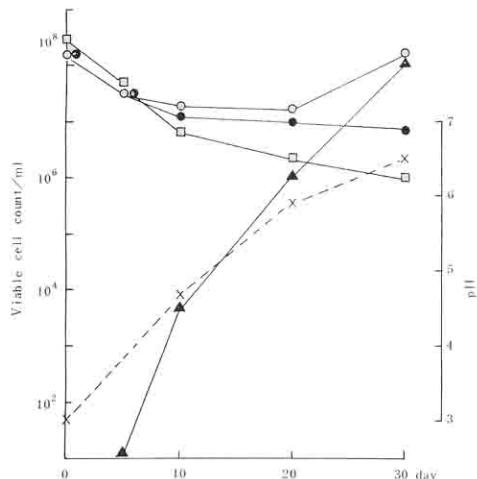
Fig.2. Changes of microbial flora and pH during preservation of fermented turnip at 10℃



○ Total bacteria ● Lactic acid bacteria  
 □ Yeasts ▲ Gram negative rods × pH  
 Fig.3. Changes of microbial flora and pH during preservation of fermented turnip at 20°C



L. Lactic acid bacteria Y. Yeasts  
 A. *Alcaligenes* B. *Bacillus*  
 C. Coryne-forms E. Enterobacteriaceae  
 Fig.5. Change of microbial flora during preservation



○ Total bacteria ● Lactic acid bacteria  
 □ Yeasts ▲ Gram negative rods × pH  
 Fig.4. Changes of microbial flora and pH during preservation of fermented turnip at 30°C

3. pH上昇要因の解明 微生物叢がほとんど乳酸菌と酵母だけの状態の発酵カブの漬液のpHが徐々に上昇し、その結果、他の微生物の増殖を許し、腐敗に至ったが、そのpH上昇要因を明確にするために、発酵カブより分離した産膜性酵母のうち、*Debaryomyces* spを乳酸で

pHを3.6に調整した培地に接種後30°Cで培養し、酵母の増殖およびpH変化を見た。Fig.6に示したように酵母は、2日目頃から急激に増殖はじめ6日目頃には、定常状態になったが、pHの変化は、増殖より遅れて4日目から徐々に上昇はじめ、10日目にはpH6に達した。

腐敗時に分離された細菌の中で、Enterobacteriaceaeに属する細菌が、低pHにおいても増殖可能で特に*Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*が、

pH4.2ではほとんど増殖しないが、pH4.4では増殖したので、前記の培地を乳酸でpHをやや高めの4.6に調整した培地に接種し、増殖、pH変化を見た。Fig.7に示したように、7日目にはpH8.5付近にまで達した。以上から、酵母によるpH上昇が起因となり、低pHでも比較的生育しうるEnterobacteriaceaeが増殖はじめ、これが、さらにpHを上昇させ腐敗にいたらしめることが推察された。

4. 有機酸の生成と微生物の関係 カブ漬の保存中に保存温度が高いほど、悪臭の発生度合が多く、しかも早かったが、この原因は酵母による乳酸消費にともなってpHが上昇することが、pH上昇要因の解明で明きらかになったが、さらに明確にするために、8種類の菌株として酵母1、グラム陽性菌2、グラム陰性菌5株をブドウ糖、乳酸培地に培養後、それぞれの菌株が生成した有

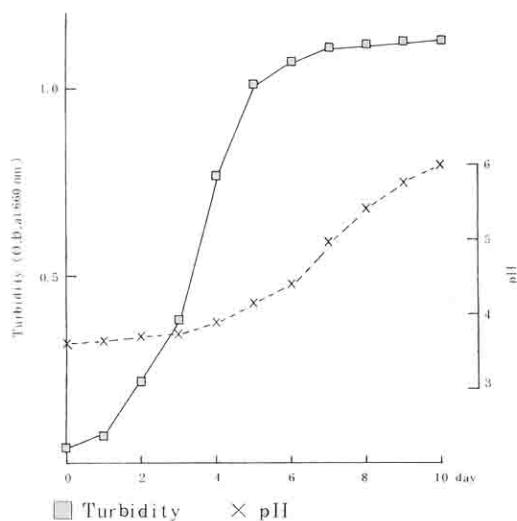
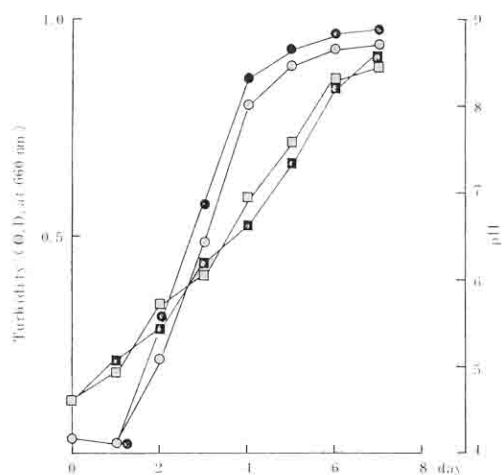


Fig. 6. Changes of pH of a medium in the course of yeast growth



○ Turbidity of *Ent. aerogenes* in the medium  
 ● Turbidity of *Cit. freundii* in the medium  
 □ pH value of *Ent. aerogenes* in the medium  
 ■ pH value of *Cit. freundii* in the medium  
 Fig. 7. Changes of pH of the medium in the course of bacterial growth

機酸量と組成から検討した。総酸量を 100 として、個々の有機酸割合を Fig. 8 に示したが、有機酸として、香気に関与するものは揮発性有機酸であるギ酸、酢酸、ブロビオン酸、iso, n-酪酸、iso, n-吉草酸であるが、発酵漬物には前 4 者が主なものである。発酵漬物の製造は乳酸菌、酵母の働きによるものが大であるが、この漬

物の酸味は、乳酸菌が糖を分解して生成した乳酸が主なものであるので、製造工程ではブドウ糖培地、保存中ににおける有機酸と微生物の関係は、乳酸培地の有機酸生成のパターンとして見ると、ブドウ糖培地では、8種類の菌株のうち、酵母は有機酸の生成と各種エステル類の生成、香気に関与していると思われる。グラム陽性菌 2 株のうち、*Lactobacillus plantarum* は乳酸の生成に特に顕著であった。グラム陰性菌ではかなりの量の有機酸を生成するものもあるが、糖は製造中に消費されほとんどない状態であり、カブ漬の保存中の主な成分は食塩と有機酸であるので、乳酸培地における有機酸組成から見ると、カブ漬を高温で保存した時に発生した刺激性のある悪臭は、揮発性有機酸の中でももっとも悪臭の激しい iso, n-酪酸に刺激のあるギ酸、一定量以上の酢酸の混合物であると思われた。これらは、酵母やグラム陽性菌が生成したものではなく、図に示した代表的な 5 株の陰性菌が、pH の上昇とともに増殖し生成したものと推察された。

## 考 察

乳酸発酵したカブ漬の有機酸組成は、高波らの報告にもあるように、主に乳酸、酢酸、コハク酸であった。これらを含むカブ漬を 5~30°C に保存した場合の有機酸変化は、5°C に保存した場合では、各有機酸とも相対的に減少し、pH の上昇とともに酪酸が新たに検出された。また、10~30°C のように高温になるに従って、pH の急激な上昇が見られ、乳酸、コハク酸の減少、酢酸の増加、多量のギ酸、酪酸が検出され、刺激性のある悪臭が発生した。この悪臭物質は種々あると思われるが、有機酸としては、これら揮発性有機酸であるギ酸、酢酸、酪酸の混合物であると思われた。そして、この揮発性有機酸は、ブドウ糖、乳酸培地それぞれに 8 種類の菌株を培養し、液中の有機酸を定量定性した結果、グラム陽性菌は、*Micrococcus varians* を除いて、ブドウ糖培地からは生成したが、乳酸培地では生成せず、グラム陰性菌は両培地から生成したことから、保存中に発生した悪臭は、グラム陰性菌が生成したものと思われた。また、揮発性有機酸以外に硫化水素と思われる悪臭も感じられたが、これは、*Citrobacter freundii* に起因するものと思われた。

乳酸発酵した漬物の品質保存限界を、総酸量 1% 以下とした場合、5°C 保存では 100 日、10°C では 10 日、20, 30°C では 10 日間すらも保存できなかった。また、腐敗初期には酵母が乳酸を消費し pH が上昇し、ある程度まで

Strains	Glucose			Lactic acid		
	(%)			(%)		
<i>Debaryomyces Kloekkerii</i>	F	A	L	S	A	L
			T.a(488)			T.a(62)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	A		L		trcce.	L
			T.a(1563)			
<i>Micrococcus varians</i>	F	A	L	S	trcce.	L
			T.a(313)			
<i>Enterobacter cloacae</i>	F	A	L	S	F	A P L M
			T.a(1003)			T.a(57) trcce. n-B. G. M
<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	A	L	S	F	i-B n-B L S
			T.a(712)			T.a(34)
<i>Citrobacter freundii</i>	A		L	S	F	A P L S
			T.a(516)			T.a(71)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A	L	Le	S	F A	L S
			T.a(41)			T.a(9) trcce. p
<i>Alcaligenes faecalis</i>		none			F A	L S
					T.a(43)	
						trcce. n-B. G. S. M

F : Formic acid

G : Glycolic acid

A : Acetic acid

Le : Levulinic acid

i-B : iso-Butyric acid

M : Malic acid

n-B : n-Butyric acid

P : Propionic acid

L : Lactic acid

T.a : Total acid (mg/100 ml)

S : Succinic acid

Fig.8. Production of organic acids by various microorganisms derived from fermented turnips

pHが上昇すると、20°C以下の保存においては、次に、Enterobacteriaceaeに属する細菌、特に、*Enterobacter*が多く増殖した。これは、*Enterobacter*が低温

においても比較的増殖しやすく、また、8%食塩中あるいは低pH(4.4)でも増殖可能であることから、これらの点で他の汚染細菌よりも増殖に適っていたからだと

思われた。一方、30℃保存においては、コリネ型菌、*Alcaligenes* *Bacillus* など多種類の細菌が腐敗時に検出されたが、これは、pHの上昇が急激で、また、温度も高いことからこれらの細菌が、ほぼ同時に増殖可能となったことにあると思われた。従って今回のような開放系で行った保存においては、保存用樽の付着面、浮遊細菌、人為的に汚染される細菌などが、主に発酵カブ漬液の pH が上昇することによって増殖したものと考えられ、今回は以上のような結果になったが、保存条件、環境の相違によっては、腐敗のパターンも当然変化するものと思われた。

## 要 約

乳酸発酵したカブ漬を5～30℃の温度に保存し、保存中の有機酸、微生物叢の変化などを調べ品質保持限界を明らかにした。

(1) 乳酸発酵したカブ漬の有機酸組成は、主として乳酸、酢酸、コハク酸であるが、保存中に乳酸、コハク酸が減少し、酢酸の増加、新たにギ酸、酪酸が検出され刺激性の悪臭が発生した。この傾向は保存温度が高いほど著し

かった。

- (2) カブ漬の品質保持限界を、総酸量1%以下とした場合、5℃保存では100日、10℃では10日、20、30℃では10日間すらも保持できなかった。
- (3) 保存中の微生物叢は、保存当初は主として酵母と乳酸菌であるが、酵母による乳酸の消費により pH の上昇を招き、Enterobacteriaceae に属する細菌やコリネ型菌、*Alcaligenes* *Bacillus* などが増加し、腐敗を呈するようになった。

## 文 献

1. 宮尾茂雄、青木睦夫：東京農試研究報告。13, 102 (1979)
2. 微生物学ハンドブック編集委員会：微生物学ハンドブック。1399( 1964 )
3. 高波修一、榛名芳夫、吉田 勤、中島富衛：食品工誌。21, 450 ( 1974 )
4. 高波修一、榛名芳夫、吉田 勤、中島富衛：食品工誌。25, 10 ( 1978 )