

新しい風味の減塩発酵漬物の開発

[平成 30～令和 2 年度]

中山里彩・竹友直生・佐藤万里・三枝静江・磯野未来
(食技セ)

【要 約】低温蒸気加熱したキャベツに塩、酢酸・酢酸ナトリウム、酪農用乳酸菌を添加し、25℃ 3 日間の発酵で、従来の漬物用乳酸菌より程よい酸味で、保存下でも総酸度の上昇を抑えた発酵漬物を製造できる。この漬物は遊離アミノ酸が多く、多様な有機酸を含む。

【目 的】

消費者の健康意識の高まりから、漬物の減塩化が求められている。また、低塩分下では、耐塩性の弱い酪農用乳酸菌の生育が可能であることから、乳製品に利用される酪農用乳酸菌を漬物の製造に活用し、発酵乳製品特有の香味を付与した新しい風味の減塩発酵漬物を開発する。本研究では、減塩下における衛生指標細菌の抑制条件や、中～高温性乳酸菌である酪農用乳酸菌による漬物の発酵条件を、漬物用乳酸菌利用時と比較・検討した。

【成果の概要】

1. 乳酸菌スターター漬物用：LP (*Lactobacillus plantarum*)，および酪農用：LC (*L. casei*)，LH (*L. helveticus*)，YC (*L. bulgaricus*+*Streptococcus thermophilus*) の 4 種類について (表 1)，各乳酸菌が生育可能な塩分および温度を MRS 液体培地にて確認した。その結果、25℃以上であれば、塩分 2%以下で全ての乳酸菌が生育した (表 2)。次に、塩分 2%の 7 種野菜ペーストに各乳酸菌を 10⁷CFU/g 程度添加し、25℃で発酵させると、全ての乳酸菌において、キャベツでの pH が最も低下したことから (表 3)，以降の実験では原料野菜としてキャベツを使用した。
2. 原料キャベツの初発菌数を低減するため、発酵前の殺菌条件を検討した。次亜塩素酸ナトリウム溶液浸漬処理 (200ppm, 5 分間)、スチームコンベクションによる低温蒸気加熱処理 (70℃, 10 分間)、および沸騰水による熱湯浸漬処理 (100℃, 1～5 分間) を比較した結果、一般生菌数の低減や食感の観点から、低温蒸気加熱処理を選択した (表 4)。
3. 塩分 2%で衛生指標細菌の増殖リスクを抑えた漬物を製造するため、酢酸・酢酸ナトリウム (pH 5) の添加濃度を検討した。初めに、pH 5 に調整したトリプチケースソイブロス (TSB) 培地に、酢酸・酢酸ナトリウムを両者の濃度の和が 0～80mM になるように添加した。この調整培地に 6 菌種 8 菌株の衛生指標細菌を添加し、各菌株の増殖の有無を目視で確認した。その結果、初発濃度 60mM 以上 (pH 5) で全菌株の増殖が阻害された (表 5)。次に、濃度が 0～80mM になるように酢酸・酢酸ナトリウムを添加した塩分 2%のキャベツペーストに、代表的な衛生指標細菌である大腸菌および TSB 培地にて増殖阻害濃度の高かった黄色ブドウ球菌を添加し、菌数を測定した。その結果、大腸菌は初発濃度が 40mM 以上で、黄色ブドウ球菌は 60mM 以上 (各 pH 5) でいずれも増殖が阻害された (図 1)。さらに、濃度 60mM, 初発 pH 5 となるように酢酸・酢酸ナトリウムを添加した塩分 2%のキャベツペーストに、4 種の乳酸菌を添加した結果、いずれも 72 時間以内に pH 4.2 以下に低下し、良好な乳酸発酵が確認されたことから (図 2)，漬物製造時に

- 4 M の酢酸・酢酸ナトリウム (pH 5) を 1.5% 添加 (最終濃度 60mM) することとした。
4. 乳酸菌 4 種 (LP, LC, LH, YC) を用いて、図 3 の工程でキャベツの漬物を製造し (漬込量 500g), 製造時の乳酸菌数, pH, 総酸度, 有機酸量をそれぞれ測定した。対照として, 乳酸菌を添加しない漬物も作製し, 同様の項目を測定した。その結果, 酪農用 LH の乳酸菌数はほぼ変化しなかったが, その他の乳酸菌は 10^9 CFU/g 程度まで増加した (図 4)。また, 漬物用 LP 添加区では, 72 時間後の pH は 4.0 以下, 総酸度は 1.0% 以上となったが, 酪農用 LC, LH, YC 添加区では, いずれも pH は 4.0 より低下せず, 総酸度は 1.0% 未満となり, 乳酸量は漬物用と比較して低かった (図 4, 5)。これらの結果から, 酪農用乳酸菌による酸味の抑制効果を確認できた。発酵後の酢酸量は全試験区とも初発酢酸量と同程度で (図 5), かつ, MRS 液体培地にて各乳酸菌によるガス産生はなかったため (データ未掲載), 供試乳酸菌の発酵形式は, 酢酸やガスを産生しない, ホモ型の可能性が高い。また, 酪農用 LH および YC 添加区では, うま味と関連するコハク酸も生成された (図 5)
 5. 漬物の発酵開始時に大腸菌および黄色ブドウ球菌を添加し, pH および菌数を測定した結果, 乳酸発酵に伴い pH が低下し (データ未掲載), 各衛生指標細菌数は減少したが, その減少率は乳酸菌によって異なった (図 6)。
 6. 製造した漬物の保存性を確認するため, 発酵させた漬物 (漬込量 1 kg) を 10°C で 4 週間保存し分析を行った。YC 添加区は漬込量を増やすと発酵不十分となったため (表 6), 以降の検討から除外した。LC 添加区は冷蔵時も乳酸菌が増加し, 総酸度は冷蔵 1 週間で 1.0% を超え, 冷蔵 3 週間で pH が 3.9 まで低下した。一方, LH 添加区は冷蔵 4 週間後も pH 4.0 を下回らず, 総酸度も 1.0% を超えなかった (表 6)。LP および LC 添加区では, 発酵および冷蔵の過程でリンゴ酸とクエン酸が減少した (図 7)。リンゴ酸は乳酸菌のマロラクティック発酵により乳酸に変換され, クエン酸は糖との共代謝に利用されたと考えられる。一方, LH 添加区は, 対照区と同程度のリンゴ酸とクエン酸が残存し, さらに, コハク酸とピルビン酸を生成した (図 7)。
 7. 乳酸菌 3 種 (LP, LC, LH) を用いて製造した漬物について, 職員 11 名をパネルとして, 7 段階評点法による官能評価を行った (図 8)。その結果, 総合評価 (漬物の好ましさ) は酪農用 LH 添加区で最も高く, 漬物用 LP 添加区より有意に高かった。また, LH 添加区の酸味は LP および LC 添加区より有意に弱かったことから, 酸味の弱い漬物ほど好まれる結果となった。香りの項目では, 試料間の差はみられなかった (図 9)。また, 発酵後の漬物の遊離アミノ酸を測定した結果, 総遊離アミノ酸量の多い漬物ほど高評価であった (表 7, 図 9)。一般に, *L. helveticus* はタンパク質分解能が高いことが知られており, 総遊離アミノ酸量は LH 添加区で最も多く, 対照区の漬物と比較して 1.3 倍に増加した。なかでも, 甘味に関係するアラニン (Ala, 下線) は対照区の 2.2 倍に増加した (表 7)。
 8. 以上のことから, 酪農用乳酸菌 LH を利用したキャベツの発酵漬物は, 多様な有機酸組成で, 総遊離アミノ酸量が多く, 官能評価における総合評価が高かった。さらに, 漬物用乳酸菌よりも程よい酸味で, 長期の冷蔵保存時も総酸度の上昇が抑えられることから, LH はキャベツの減塩発酵漬物の製造に適していると判断された。

【残された課題・成果の活用・留意点】

発酵により生じた漬物の香気成分の評価方法を検討する必要がある。他の野菜に適した加工条件や乳酸菌の発酵条件を検討する必要がある。

【具体的データ】

表1 供試乳酸菌スーター

乳酸菌種	
漬物用	LP (<i>Lactobacillus plantarum</i>)
	LC (<i>Lactobacillus casei</i>)
酪農用	LH (<i>Lactobacillus helveticus</i>)
	YC (<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)
	+ <i>Streptococcus thermophilus</i>)

表3 野菜ペースト発酵後の pH

野菜の種類	発酵前	漬物用			
		LP	LC	LH	YC
キャベツ	5.5	3.2	3.2	3.2	3.2
ニンジン	5.3	3.4	3.7	3.5	3.9
コマツナ	5.8	4.6	4.8	4.7	4.7
アシタバ	5.4	3.7	3.7	3.7	3.6
葉ダイコン	5.7	4.5	4.3	4.4	4.2
ミズナ	5.8	3.9	3.8	3.9	4.0
タイサイ	5.9	3.9	3.9	3.9	3.9

各乳酸菌を各種ペースト（塩分2%）に添加し、25℃で72時間発酵後のpHを計測した。

表5 TSB 培地における衛生指標細菌に対する酢酸・酢酸ナトリウムの増殖阻害濃度

菌株	増殖阻害濃度 (mM)
<i>Escherichia coli</i> JCM 1649	40
<i>Escherichia coli</i> JCM 3972	40
<i>Escherichia coli</i> O157 TFC 204-2	40
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 12732	60
<i>Salmonella enterica</i> JCM 1652	40
<i>Listeria monocytogenes</i> JCM 7671	40
<i>Vibrio fluvialis</i> NBRC 103150	10
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152	20

調製したTSB培地に、各菌株の培養液を1%添加し、25℃で72時間培養し、目視で増殖を確認した。培地の塩分は0.5%。

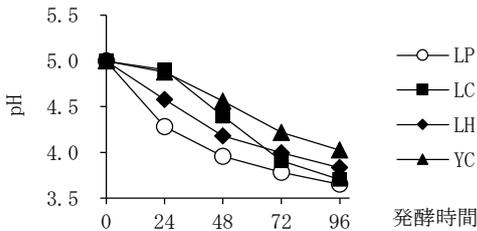


図2 キャベツペーストに酢酸・酢酸ナトリウム60mMと乳酸菌を添加した際のpH値の変化
塩分2%のペーストに酢酸・酢酸ナトリウム(pH5, 60mM)と各乳酸菌を10⁶CFU/g程度となるように添加し、25℃で発酵させpHを計測した。

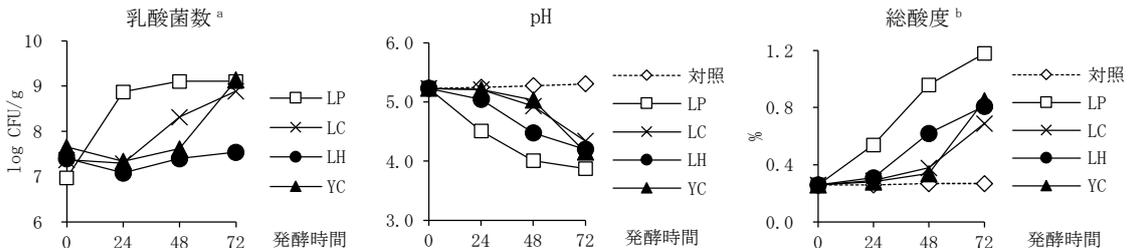


図4 キャベツ漬物の発酵過程における乳酸菌数, pH, 総酸度の変化

a) 測定にはMRS寒天培地とBCP培地を使用した(*S. thermophilus*はMRSにおける生育が悪かったため、YCのみBCP培地の結果を掲載)。blankは漬物の10倍希釈液2mlから、MRS寒天培地においてコロニーは検出されなかった。
b) 総酸度は滴定を行い、乳酸換算した値を示した。

表2 MRS 液体培地における乳酸菌の生育可能温度, 塩分の検査

NaCl (%)	10℃				15℃				20℃				25℃				35℃			
	LP	LC	LH	YC	LP	LC	LH	YC	LP	LC	LH	YC	LP	LC	LH	YC	LP	LC	LH	YC
4	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++	-	±
3	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-	++	++	-	-	++	++	-	-	++	++	-	(+)
2	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-	++	++	-	±	++	++	(+)	++	++	++	+	++
1	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-	++	++	-	±	++	++	+	++	++	++	+	++
0	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-	++	++	(+)	±	++	++	+	++	++	++	+	++

MRS 液体培地に、各スーターの希釈液を2%添加し、目視で生育を確認した。
++: 1日で生育, +: 2日で生育, (+): 5日後生育, ±: 5日後やや生育, -: 5日後生育無し

表4 各殺菌によるキャベツの生菌数と食感の変化

方法	生菌数 (CFU/g)	食感
水洗前	1.8×10 ⁶	生の硬さ
水洗後	1.1×10 ⁵	生の硬さ
200ppm, 5分 次亜塩素酸ナトリウム溶液浸漬処理	1.6×10 ⁵	生の硬さ
70℃, 10分 低温蒸気加熱処理	<300 ^a	歯ごたえあり
100℃, 1分 熱湯浸漬処理	ND ^b	やや歯ごたえあり
100℃, 2分 熱湯浸漬処理	ND ^b	ほぼ歯ごたえなし
100℃, 5分 熱湯浸漬処理	ND ^b	歯ごたえなし

一般生菌数の測定にはSMA培地を用いた。
試料の10倍希釈液2mlから、a) 1個のコロニーが検出, b) コロニーは検出されず。

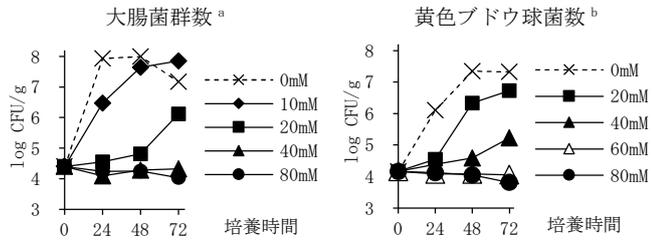


図1 キャベツペーストにおける大腸菌および黄色ブドウ球菌の増殖に対する酢酸・酢酸ナトリウム添加の影響

キャベツペーストにa) 大腸菌 *E. coli* JCM 1649, b) 黄色ブドウ球菌 *S. aureus* NBRC 12732をそれぞれ10⁶CFU/g程度となるように添加し、25℃で発酵させた。

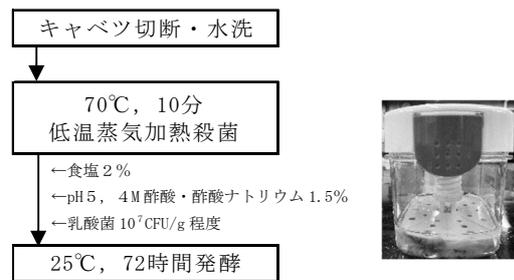


図3 漬物の製造工程(左)と発酵時の様子(右)

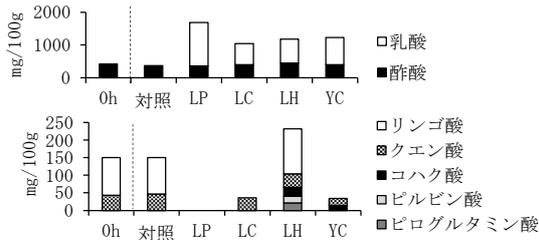


図5 発酵後キャベツ漬物の有機酸組成
キャピラリー電気泳動装置を用いて測定。0hは発酵前の有機酸量。

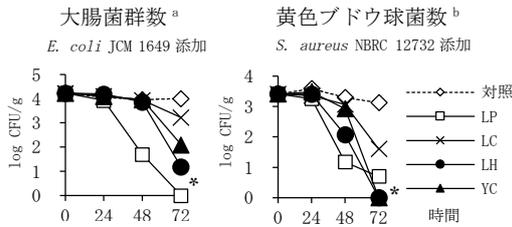


図6 キャベツ漬物に乳酸菌と衛生指標細菌を添加時の菌数変化

a) デソキシコレート寒天培地使用 b) ペアード・パーカー培地使用
*漬物の10倍希釈液2mLから、各培地にコロニーの検出なし。

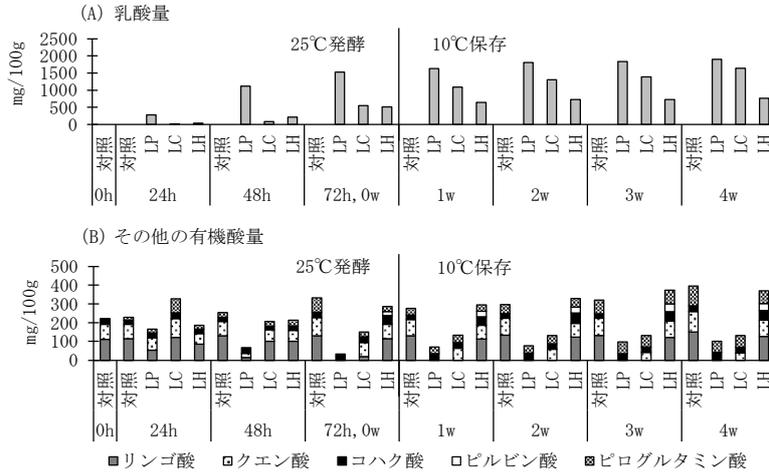


図7 キャベツ漬物を25°Cで72時間発酵後、10°Cで4週間保存したときの有機酸組成の変化 (A:乳酸, B:その他)

キャピラリー電気泳動装置を用いて測定した。0hは発酵前の有機酸量。
製造時に酢酸を添加しており、どの区もほぼ一定であったため、図中では省略した。

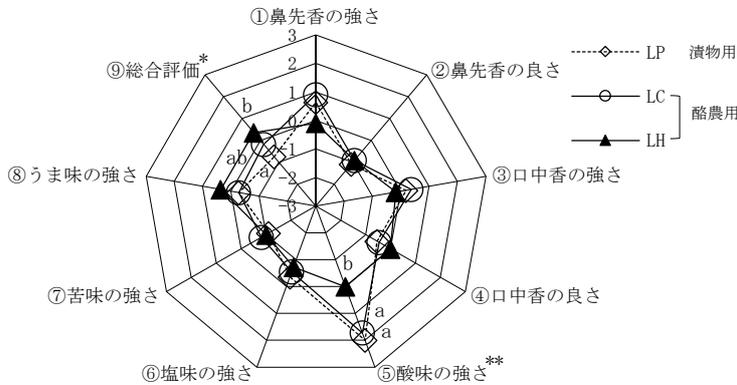


図9 キャベツ漬物3種の官能評価結果

パネル11名による評点3:非常に強い(良い) ~ -3:非常に弱い(悪い)の平均値を示した。
鼻先香:密閉容器のフタを開けた時の香りを, 口中香:食べている時の香りを評価した。
統計解析は, 試料とパネルを要因とした二元配置分散分析およびTukeyのHSDによる多重比較を行った。 ** : P<0.01, * : P<0.05で有意差あり。a, b異なる文字間に有意差あり。

表6 発酵させたキャベツ漬物を冷蔵保存したときのpH, 総酸度, 乳酸菌数の変化

	10°C保存	乳酸菌				
		無添加 対照	漬物用 LP	酪農用 LC	酪農用 LH	酪農用 YC
pH	0w	5.4	3.9	4.5	4.4	5.2
	1w	5.4	3.9	4.1	4.2	5.2
	2w	5.4	3.8	4.0	4.2	5.2
	3w	5.4	3.8	3.9	4.2	5.3
	4w	5.4	3.8	3.9	4.2	5.1
総酸度 ^a (%)	0w	0.3	1.4	0.7	0.8	0.4
	1w	0.4	1.5	1.1	0.9	0.4
	2w	0.4	1.6	1.3	1.0	0.4
	3w	0.4	1.6	1.4	1.0	0.4
	4w	0.4	1.6	1.6	1.0	0.4
乳酸菌数 ^b (CFU/g)	0w	ND ^c	1.7×10 ⁹	7.7×10 ⁸	2.8×10 ⁷	1.6×10 ⁷
	1w	ND ^c	7.0×10 ⁸	1.1×10 ⁹	5.3×10 ⁷	9.2×10 ⁶
	2w	ND ^c	5.4×10 ⁸	1.4×10 ⁹	3.9×10 ⁷	1.4×10 ⁷
	3w	ND ^c	3.1×10 ⁸	1.1×10 ⁹	2.6×10 ⁷	6.2×10 ⁶
	4w	ND ^c	1.9×10 ⁸	6.4×10 ⁸	1.6×10 ⁷	7.1×10 ⁶

72時間発酵後の漬物(0w)を冷蔵し, 1週間ごとに測定した。

a) 総酸度は滴定を行い, 乳酸換算した値。 b) MRS寒天培地を使用。

c) ND: 漬物10倍希釈液2mLからコロニーの検出なし。



図8 官能評価の様子

試料の提示順はラテン方格を用いてパネルごとに替え, P, Q, Rの順での評価を指示した。

表7 発酵後キャベツ漬物の遊離アミノ酸組成

	漬物用		酪農用	
	対照	LP	LC	LH
P-Ser	0.3	0.5	0.4	0.4
Tau	0.1	0.2	0.2	0.2
Urea	35.7	38.0	31.2	40.3
Asp	6.4	6.3	7.8	5.6
Thr	2.9	1.3	2.8	3.8
Ser	4.3	3.5	5.0	6.1
Asn	11.2	12.2	11.8	13.6
Glu	3.9	9.0	7.9	3.7
Gln	125.6	132.0	146.2	158.8
Sar	0.3	0.0	0.2	0.1
a-AAA	0.1	0.1	0.3	0.2
Gly	1.1	2.2	1.8	1.8
Ala	6.2	5.5	7.1	13.7
a-ABA	0.1	0.1	0.0	0.1
Val	3.3	1.0	2.6	4.3
Cys	1.4	1.5	1.5	1.6
Met	0.6	0.4	0.3	0.7
Cysthi	0.6	1.1	0.9	0.6
Ile	2.3	0.4	1.3	2.7
Leu	1.1	0.1	0.6	1.4
Tyr	0.5	0.0	0.0	0.4
Phe	0.8	0.0	0.2	0.8
GABA	9.7	11.1	11.5	12.2
Trp	3.7	0.0	3.1	5.4
EOHNH ₂	0.7	0.9	0.8	0.9
NH ₃	1.0	1.5	1.4	1.4
Hylys	0.0	0.0	0.1	0.0
Lys	0.9	1.3	1.8	1.2
His	3.4	3.3	3.9	4.4
Arg	6.8	7.3	8.5	10.0
Pro	3.6	4.4	4.9	5.7
Total	238.7	245.0	266.1	302.3

アミノ酸自動分析装置を用いて測定を行った。(分析値: mg/100g)