

糠床における乳酸発酵によって 生成する乳酸の分析

梅 田 孝 男 ・ 草 桶 秀 夫
大 道 幸 枝 ・ 澤 崎 正 廣 ・ 桜 井 武 尚

Analysis of lactic acid in Nukadoko produced by lactic acid fermentation

Takao UMEDA · Hideo KUSAOKE
Yukie DAIDO · Masahiro SAWAZAKI · Takehisa SAKURAI

Lactic acid fermentation using Nukadoko was made over a period of one week at 40°C, and total acid contents and pH in Nukadoko were 1 % and 4.9, respectively.

The existences of lactic acid and unknown organic acids in extracts from Nukadoko were confirmed by gas-liquid chromatography analyses.

The excellent pickle was obtained by the use of Nukadoko containing total acid contents of 0.7~0.8% from fermentation at 20°C over one week.

1. ま え が き

漬け物は古代において、塩漬けによる保存食であったが、今日では、なす、きゅうり、白菜をはじめとする野菜の漬け物は多種多様であり、日本人の食生活には欠かすことのできないものとなっている。酒、しょうゆ、味噌とならんで漬け物は、発酵によっておいしい風味を生じるものであり、乳酸発酵が漬け物に関与しているといわれている。

最近、バイオテクノロジーは急激な進歩をとげており、日本の伝統産業である微生物を利用した発酵工業は世界の先駆者的役割をなしている。

漬け物のうちで糠漬けは、米糠、食塩、および水を原料にして、糠床が作られるものであり、一般的には1週間程度で乳酸発酵によって糠床中に乳酸や、うまみ成分（アミノ酸、核酸など）が生成される。

支倉らは、糠床中の食塩濃度によって、漬け物の味が変化し、一般に、食塩濃度が5~15%で、おいしい漬け物が得られると報告している¹⁾。しかしながら、乳酸発酵による糠床中の乳酸生成量と、漬け物のうまみとの関係について調べた報告は見あたらない。また糠床中の乳酸の定量は、中和滴定によって総酸量値として求められており、真の乳酸含量を求めた報告も見あたらない。

い^{2,3)}。

本研究では、糠床中に生成する乳酸を定量し、漬け物のうま味に及ぼす糠床中の乳酸量の影響について検討した。

2. 実験方法

2-1 原料と機器分析

糠床としての米糠、及び食塩は市販品を用い、米糠は、いり糠（黒保商店製）を使用した。大豆蛋白は和光純薬社製を用い、プロテアーゼ酵素（放線菌由来）はベーリンガー社製のものを使用し、その比活性は約0.5U/mgであった。

分光光度計は日立社製の U-3200を用い、測定波長は400nm～300nmであった。なお、SCAN SPEEDは120nm/min、PLOTTER-MODEは20nm/minで行った。

また、ガスクロマトグラフィーは HITACHI-103(日立製作所製)を用い、検出器としては TCDを使用した。カラムには1.5%OV-17（長さ100cm）を、キャリアーガスにはヘリウムを用いて、初期温度80℃から、昇温10℃/minにて200℃まで測定した。

2-2 糠床の調製法

本研究で用いた糠床は4種であり、その配合組成を Table 1 に示した。No. 1, 及び No. 2 は一般的に行なわれている配合割合であり、これを一般床とした。No. 3 は No. 2 にプロテアーゼを配合したもので、No. 4 は、さらに蛋白を配合したものである。

Table 1 Composition of materials in Nukadoko

material sample no.	rice nuka (g)	salt (g)	water (g)	protease (g)	soybean protein (g)	salt content (%)
1	1,700	410	2,000	0	0	10
2	2,000	306	2,800	0	0	6
3	2,000	306	2,800	1.0	0	6
4	1,500	306	2,800	1.0	500	6

これらの調製法は次の通りである、すなわち、すべての配合物を秤量した後、食塩、蛋白、プロテアーゼを順に一定量の蒸留水に溶解し、攪拌しながら米糠に注いだ。

以上の様に、調製した糠床は、熟成期間中、1日2回の手による攪拌を行ない、適時、なすや、きゅうりを加えた。

2-3 糠床中乳酸の分析

a) 総酸量の分析

試料10g（糠を5倍希釈した口液）を三角フラスコに採り、フェノールフタレイン溶液を、指示薬として2～3滴加え、N/10-NaOHで指定した。この時、フラスコ内の液が赤色に着色した点

を終点とし、この滴定値より、次式により総酸量を算出した。

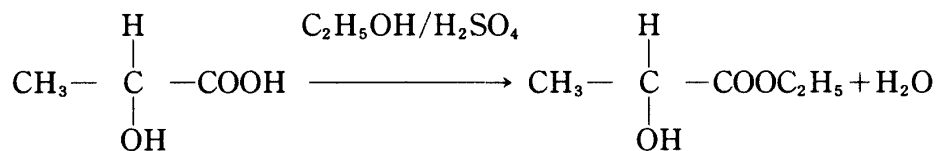
$$\text{総酸酸(\%)} = \frac{9 \times 10^{-3} \times V \times F \times 4}{\text{試料 (g)}}$$

(V : 滴定値 (ml)
F : N/10 NaOH の Factor)

b) ガスクロマトグラフィー (G. C.) による分析

ガスクロマトグラフィーを用いた有機酸分析は、一般に有機酸をメチルエステル化、または、エチルエステル化することにより揮発性有機酸として行なわれる⁴⁾。

本研究における乳酸の分析は、低炭素数であることから、溶媒ピークとの重なりを避けるため、下記の反応式に示すように、エチルエステル化（有機酸のカルボキシル基をエチルエステル誘導体とする）することによって行なった。



すなわち、試料50g をビーカーに採り、これにエチルアルコール200ml を加えた後、よく攪拌し、乳酸をエチルアルコール中に溶出した。数分間放置後、口過し、次いでエチルアルコールで充分洗浄、口過した。得られた口液に、内部標準であるカプロン酸を加え、口液を減圧濃縮し、さらにエチルアルコール、エチルエーテルを用い内容物の洗浄を2回繰り返し、水分を完全に除去した (Fig. 1 参照)。

以上の手順によって、減圧乾固された内容物に硫酸1滴を含むエチルアルコール10ml を加え、還流下に1時間反応させ、得られた乳酸エステル誘導体をガスクロマトグラフィーによって分析した。

c) 比色法による乳酸の分析

乳酸は NAD (生体内の酸化還元補酵素)、および NADH の存在下、LDH (乳酸脱水素酵素) の酵素作用によって、ピルビン酸を生成する。このことから、乳酸は、このピルビン酸による340nm の紫外 (U. V.) 部の吸収を測定することにより定量された⁵⁾。

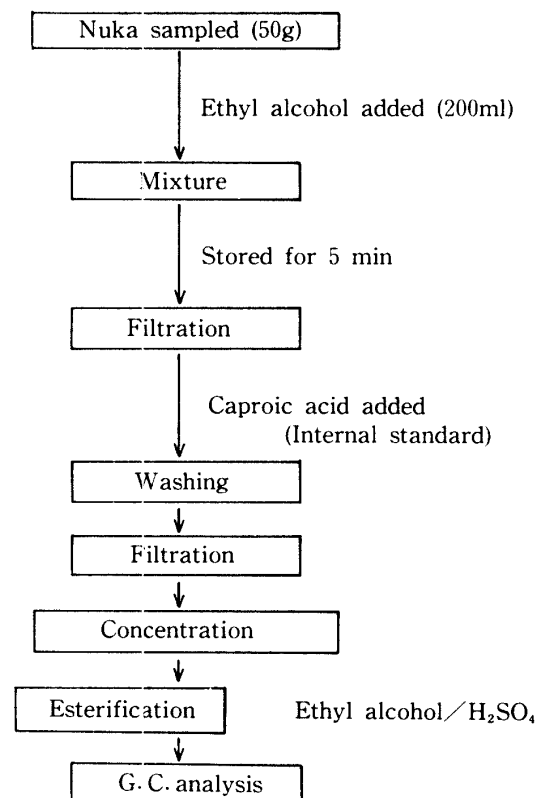
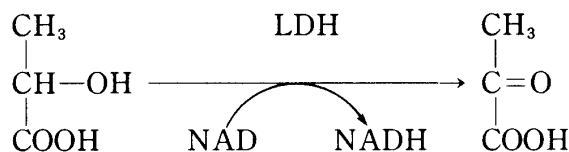


Fig. 1 Analytical procedure of lactic acid by gas-chromatography



本研究では糠床の試料10g をビーカーに採り、ガスクロマトグラフィー分析による糠床からの乳酸の抽出と同じ方法により処理して、乳酸抽出物を得た (Fig. 2 参照)。これに乳酸テスト用キット⁶⁾を用いて、340nm における乳酸に基づく吸収ピークを測定した。

2-4 試食による糠漬け物の味の評価

糠床中の乳酸量と、漬け物の味との関係を調べるため、糠床中の総酸量既知の糠床から得られた漬け物について試食アンケートを行なった。

味の判定は総合判定とし、塩分、甘さ、酸味、色合いなどの個々の評価は行なわなかった。尚、被験者は食生活での経験豊富な男子15名、女子5名であった。

3. 結果と考察

3-1 糠漬けにおける乳酸発酵による乳酸生成に及ぼす温度の影響

乳酸発酵では、一般に *Lact bacillus*, *Pedio coccus*, *Sttepto coccus* などの乳酸菌が糠中に培養されると言われている⁷⁾が、これらの乳酸菌が作用して、乳酸が生成し、漬け物に適度な酸味を与え、風味をつけるものと考えられる。

そこで、糠床の種々の熟成温度における乳酸の生成量を調べたのが Fig. 3 である。ここで求めた乳酸生成量は宮田らの方法³⁾によるもので、糠床からの抽出液をアルカリによる中和滴定法で求めた。

糠床中の抽出物に、アミノ酸や有機酸などの酸性物質が含まれていることを考慮し、この方法で求めた乳酸の定量を、“総酸量”として定義した。

Fig. 3 から明らかなように、熟成温度が高い程、総酸量の増加は著しく、約7日で総酸量は飽和値に達した。このことから、糠床中乳酸菌の増殖は、約1週間で飽和したものと考えられる。なかでも、乳酸菌の至適温度 (37℃) に最も近い、40℃の糠床では熟成4日目、すでに総酸量は1.0%にも達した。

ちなみに、一般的な熟成温度である20℃床では、約8日目頃から総酸量の増加傾向が現われ始

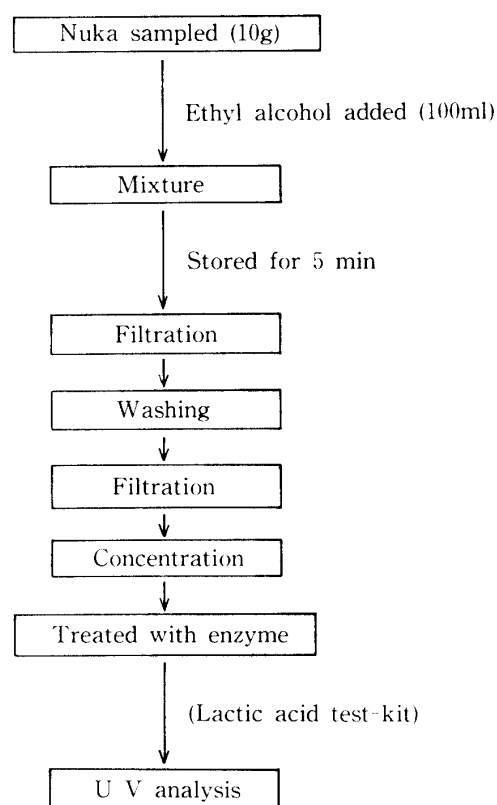


Fig. 2 Analytical procedure of lactic acid by colorimetric method

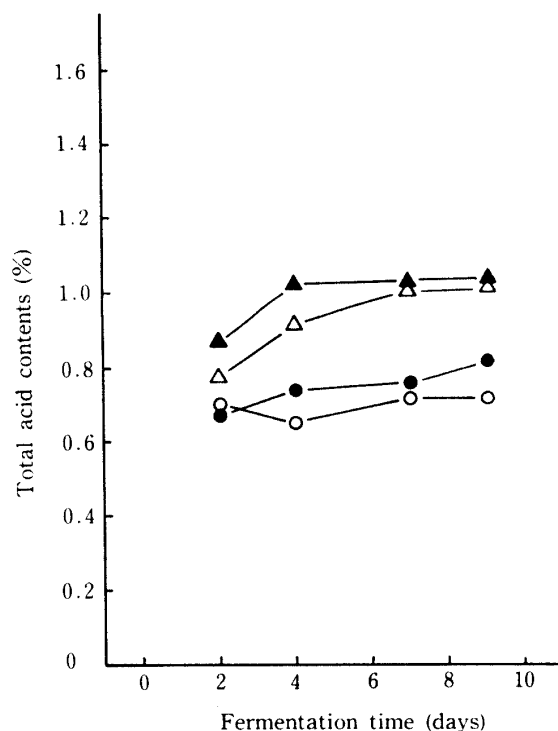


Fig. 3 Effect of contents of total acid on fermentation temperature
Symbols : ○ ; Room temperature, ● ; 20°C, △ ; 30°C, ▲ ; 40°C
Nukadoko used : Sample No. 2

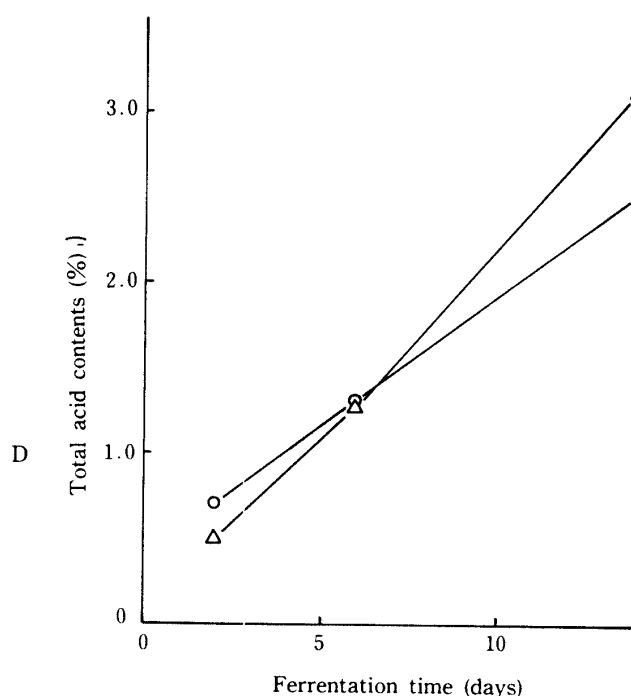


Fig. 4 Contents of total acid in Nukadoko containing protease or protease and soybean protein
Nukadoko used : ○ ; Sample No. 3, △ ; Sample No. 4

め、熟成温度が最も低い室温床では、熟成9日目でも、まだ総酸量の増加の兆しは現われなかった。

3-2 糠漬けにおける乳酸発酵による乳酸生成に及ぼす pH の影響

種々の熟成温度における pH の経時変化を調べたのが Fig. 5 である。この図からわかるように、熟成7日目、全ての糠床に於いて pH が低下、または低下傾向にあり、熟成温度が高い糠床ほど pH 値が低いことが分かった。

熟成温度が40°Cの糠床では、熟成4日目までは pH が急激に低下したが、4日目以降は pH 4.9 で一定値を示した。また、熟成温度が室温 (15°C) では、7日目まで pH は一定の5.4であり、7日目以降に pH の低下が見られた。このことから、熟成温度が40°Cでは乳酸菌の増殖が4日目で飽和に近づくが、熟成温度が室温では、7日目で乳酸菌の急激な増殖が始まったものと考えられる。

3-3 糠漬けの乳酸発酵による乳酸生成に及ぼす蛋白質添加の影響

Table. 1 に示すように糠床として、米糠、食塩、水の他に酵素 (プロテアーゼ) を配合した糠床 (Sample No. 3), および、酵素と大豆蛋白を配合した糠床 (Sample No. 4) について、糠床の熟成経過に対する総酸量の変化を調べたのが Fig. 4 である。熟成期間が5日目では、酵素配合の糠床と、酵素および大豆蛋白配合糠床との、総酸量は同程度であったが、14日目では酵素お

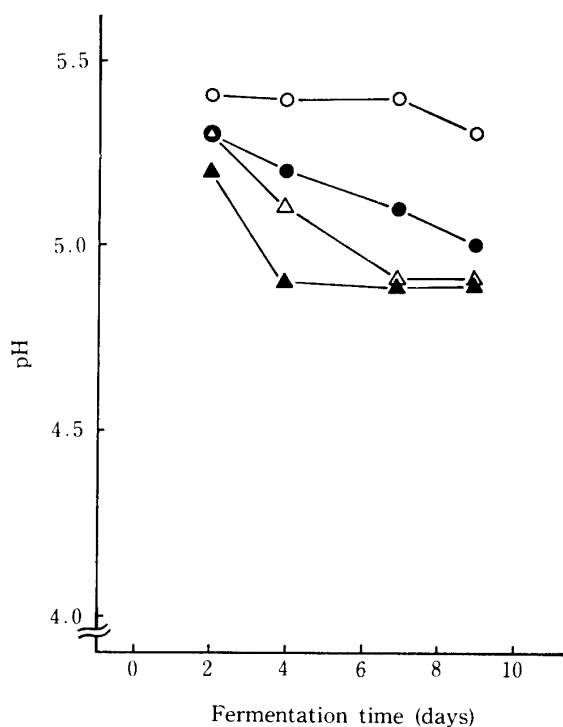


Fig. 5 Effect of contents of total acid on pH during lactic acid fermentation
Symbols : ○ ; Room temperature, ● ; 20°C, △ ; 30°C, ▲ ; 40°C
Nukadoko used : Sample No. 2

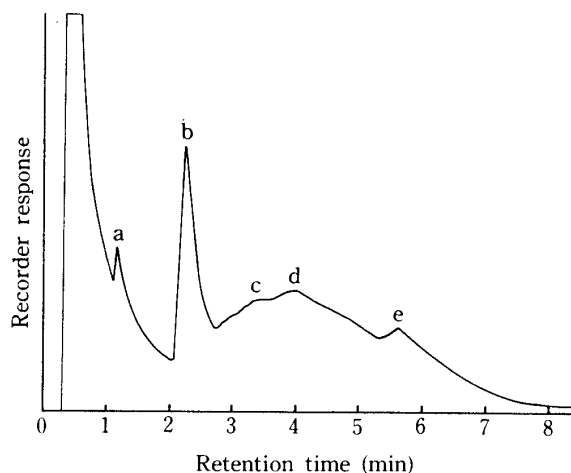


Fig. 6 Gas-chromatogram of ester derivatives of organic acids extracted with water from Nukadoko
peak a ; lactic acid, peak b ; caproic acid (internal standard), peak c~e ; unknown Nukadoko used : Sample No. 1

よび蛋白配合の糠床を用いた総酸量は酵素のみの糠床の総酸量に比べ多く、3%にも達した。これらの総酸量増加率は一般床（大豆およびプロテアーゼを含まない）の総酸量に比べ前者が3.5倍、後者が6.2倍であった。特に、蛋白配合の糠床の総酸量が高い値を示したのは、酵素によって蛋白が分解され、アミノ酸を含む、蛋白分解物が生成したためであると考えられる。

3-4 糠床中の乳酸分析

糠床中の乳酸定量法として、先に総酸量を求めたが、正確な乳酸量を把握することは出来ない。そこでガスクロマトグラフィーによる、糠床のエチルアルコール抽出物の分析を行なったのが Fig. 6 である。保持時間1.1 min に乳酸に基づくピークが認められた。またピーク c ~ e の3つの未同定ピークも現われた。これら3つの未同定ピークは有機酸に基づくピークと考えられる。

次に、糠床中の乳酸含有量を比色法によって定量したのが Fig. 7 である。これは Sam-

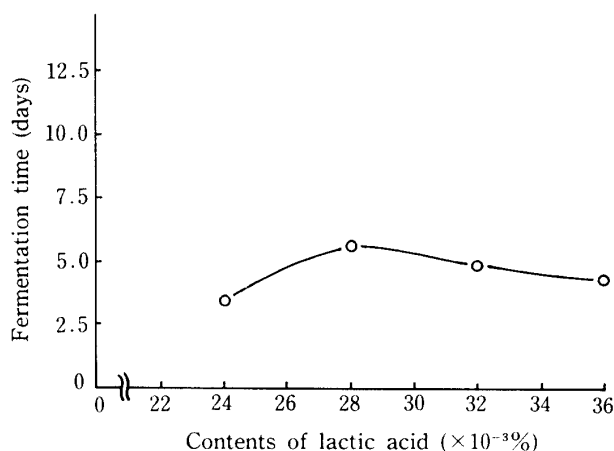


Fig. 7 Effect of fermentation time on contents of lactic acid measured from colorimetric method
Nukadoko used : Sample No. 1

ple No. 1 の熟成日数における糠床中の乳酸含有量を示したものである。この図からも明らかなように、乳酸含有量は熟成20日頃から徐々に増加傾向を示し、28日目で最高のピークに達した。

この時点での乳酸含有量は $5.5 \times 10^{-3}\%$ ($550 \mu\text{g}/10\text{g}$ 糠)であった。この値は、総酸量に比べて約1/80と微量である。このことは、先に述べたガスクロマトグラフィーによる未同定ピークの存在からも明らかなように、糠床抽出物に、相当量の各種有機酸が含有しているためであると考えられる。

3-5 糠漬け物の味の評価と糠床中の総酸量

種々の熟成温度における熟成7日目に、一昼夜、なす、および、きゅうりを漬けた物の味について試食評価を行なったのが Fig. 8 である。糠床の熟成温度が低い程 (室温 (15℃) および20℃) 漬け物の味がよく、『非常に美味しい』、または、『まあまあ美味しい』と答えた人が多かった。このことは Fig. 3 の結果からも明らかなように、総酸量として少ないほう (総酸量0.72%) が味の良い漬け物が得られるものと考えられる。

また、糠床として酵素配合した糠床と、配合しない糠床を用いた漬け物について味の比較を行なったのが Fig. 9 である。酵素配合した糠床を用いた漬け物の方が、酵素配合しない糠床に比べ、『美味しい』と答えた人は、83%と多かった。このことは、糠床に酵素を添加した場合、糠中の蛋白成分にプロテアーゼ酵素が作用し、うまみ成分であるアミノ酸が生成し、これが漬け物に浸透したためと考えられる。

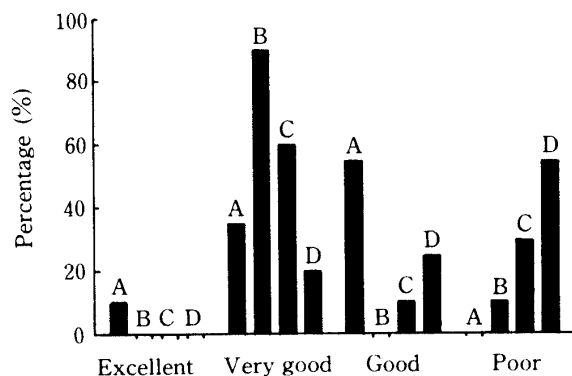


Fig. 8 Effect of fermentation temperature on taste of pickle

A ; Room temperature, B ; 20°C, C ; 30°C, D ; 40°C

Nukadoko used : Samole No. 2

Contents of total acids : A ; 0.72%, B ; 0.76%, C ; 1.00%, D ; 1.03%

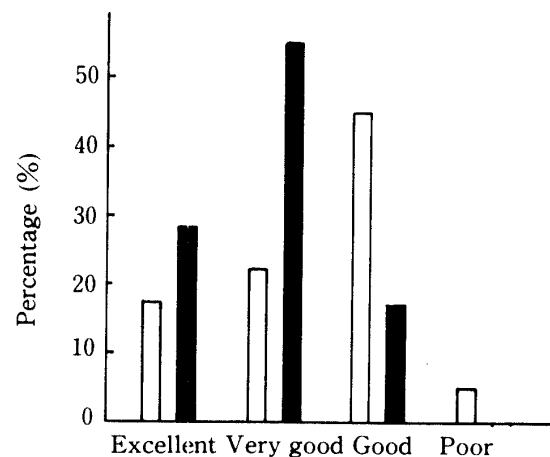


Fig. 9 Comparison of taste of pickle prepared from Nukadoko with protease or without protease Nukadoko

[■] : With enzyme [□] : Without enzyme

Nukadoko used : Sample No. 2

Fermentation temperature : Room temp. (15°C)

4. ま と め

糠床中の総酸量は、熟成温度が高い程その増加は著しく、40℃の糠床では熟成4日目で、30℃の糠床では7日目で、それぞれ飽和値に達した。この場合、糠床中の総酸量は約1%であった。

糠床の熟成温度が低い程（室温、および、20℃）総酸量は少なく、漬け物の味はよく、試食による評価では『美味しい』と答えた被験者が多かった。

糠床中のpHは、熟成7日目で全ての糠床が低下し、熟成温度が高い程pH値は低い値であった。40℃の糠床では熟成4日目で一定値を保ち、この時点でのpH値は4.7であった。

酵素（プロテアーゼ）を添加することによって香味は増し、試食による評価では被験者の83%が『美味しい』と答えた。さらに酵素と蛋白（大豆製）を併合した糠床における総酸量の増加は顕著であり、熟成14日目における総酸量は3%にも達した。これは、熟成2日目の総酸量値に対し、6.2倍もの増加率であり、酵素および蛋白添加によりアミノ酸、および蛋白質分解物が生成したためと考えられる。

ガスクロマトグラフィーによる分析では、糠床中に乳酸の存在を確認し、同時に、糠床抽出物には相当量の各種有機酸の存在が認められた。また、比色法によって求めた糠床中の乳酸含量は、室温で28日間の熟成において、 $5.5 \times 10^{-3}\%$ であり、総酸量値の約1/80であった。

5. 謝 辞

本研究は、福井工業大学産業工学研究所における一研究として行なわれたものであり、研究の遂行に当り協力された同研究所と金井学園職員の関係各位、ならびに物心両面で多大のご援助を賜った学園当局の方々に、心から感謝の意を表します。

また、諸資料の提供を頂いた精華女子短期大学の支倉サツキ先生、および、瑞穂短期大学の宮田早苗先生、ならびに試食の御協力を頂きました金井学園職員の皆様に深く感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 支倉さつき：調理科学，**6**，194（1973）。
- 2) 西原サツキ：医学研究，**29**，221（1959）。
- 3) 宮田早苗，水上美津江，瑞穂短期大学紀要，**1**，23（1984）。
- 4) 刈米孝夫：『界活性剤分析法』，p196，幸書房（1980）。
- 5) 由岐英剛，『生化学分析法』，p43，南江堂（1984）。
- 6) Lactate-UV-Test Kit, BOEHRINGER MANNHEIM Co. Ltd
- 7) 小崎道雄，谷村和八郎：『応用微生物』，p146，建帛社（1982）。