

池田町特産品を用いた加工食品の開発（平成25年度）

池田町ブドウ・ブドウ酒研究所

坂本恭祥 大淵秀樹

公益財団法人とかち財団（十勝圏地域食品加工技術センター） 四宮紀之

1. 目的および役割分担

食酢は食塩に次いで古い調味料と言われ、世界各地で多彩な食酢がつけられている。国内においては米酢の醸造は清酒とほぼ同時期より始まり、古くから食品の保存、調味に使われ伝統的和食文化の中心的な調味料として使われてきた。近年、健康志向と食酢の持つ機能性が注目され、食品の多様化とともに醸造酢、特に果実酢の需要が高まっている。しかしいわゆる本格的なヴィネガー製造は多くなく、果実由来でない原料エタノールに加水して酢酸発酵させ、それに果汁、糖等を加えるという方法がとられている。

そこで、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所と食品加工技術センターは共同研究を行い、ワイン醸造では歓迎されない酢酸菌（樽熟成中ワイン由来）を逆に利用して種酢を調製し、池田町の特産品であるワイン（山幸、ミュラー・トゥルガウ）とブドウ果汁のみを原料とした本格的なヴィネガーの開発について検討することとした。

食品加工技術センターは池田町ブドウ・ブドウ酒研究所が開発するワインヴィネガー製造法の確立と安定的な生産に向けての支援を目的に、発酵管理上特性の理解が欠かせないワインヴィネガー発酵に資する酢酸菌叢の解析・同定および種酢の保存方法に関する条件の検討を担当した。

2. 試験方法

2-1. 供試試料

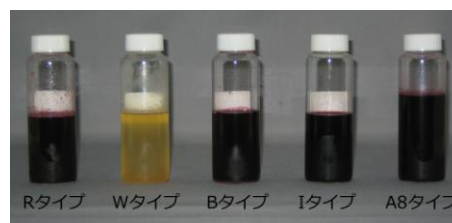
本試験では、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所で試作された、原料および仕込み時のエタノール濃度が異なる以下の5種類のワインヴィネガーを用いた。

仕込み時エタノール濃度 5%

- ①赤ワインヴィネガー（以下Rタイプという）
：赤ワイン+赤ぶどう果汁+種酢
- ②白ワインヴィネガー（以下Wタイプという）
：白ワイン+白ぶどう果汁+種酢
- ③バルサミコタイプヴィネガー（以下Bタイプという）
：赤ワイン+加熱濃縮果汁+種酢
- ④アイスワイン果汁ヴィネガー（以下Iタイプという）
：赤ワイン+氷結果汁+種酢

仕込み時エタノール 8%

- ⑤高酸度タイプヴィネガー（以下A8タイプという）
：赤ワイン（多め）+赤ぶどう果汁+種酢



2-2. 酢酸菌数計測および化学分析

ワインヴィネガーの製造を安定して行うには、ヴィネガーの状態把握による発酵管

理が重要であることから、酢酸菌数計測、糖分析、エタノール分析、有機酸分析を行った。各検査方法、分析条件は次のとおりである。

(1)酢酸菌数計測

発酵終了時のワインヴィネガー中の酢酸菌数を計測するため、GYP 白亜寒天培地に各ヴィネガーを 0.1ml 塗抹し、30℃で 96~120 時間培養後にクリアゾーンを形成したコロニー数を計数化した。培地組成を下記に示す。

グルコース	10 g	寒天	20 g
酵母エキス	5 g	エタノール	20 g
バクトペプトン	10 g	塩溶液	5ml
グリセロール	10 g	蒸留水	1000ml
炭酸カルシウム	3 g		

(2)糖分析

ワインヴィネガー中に含まれる糖（グルコースおよびフルクトース）は高速液体クロマトグラフ法により測定した。測定条件を下記に示す。

カラム	SHODEX NH2P-50 4E、4.6mmID×250mmL
移動相	水：アセトニトリル=25：75（V：V）
流量	1ml/分
カラム温度	50℃
検出器	示差屈折計

(3)エタノール分析

ワインヴィネガー中のエタノール濃度はガスクロマトグラフ法により測定した。測定条件を下記に示す。

カラム	glass I. D. 3.2φ×3.1m、PEG20M15% Uniport B
キャリアガス	窒素
流量	30ml/分
カラム温度	125℃
注入口温度	250℃
検出器、温度	FID、250℃

(4)有機酸分析

ワインヴィネガー中の有機酸 6 種（クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、酢酸）については高速液体クロマトグラフ法により測定した。測定条件を下記に示す。

カラム	RSpak KC-811×2、8.0mmID×300mmL
移動相	50mM HClO4
流量	1ml/分
カラム温度	50℃
検出器	示差屈折計

2-3.酢酸菌叢の解析

池田町ブドウ・ブドウ酒研究所が試作したワインヴィネガーにどのような酢酸菌が存在するか確認するため、酢酸菌叢の解析を行った。

発酵終了直後の W タイプおよび R タイプを前述の GYP 白亜寒天培地に塗沫培養し、さらに単一コロニーとして分離する操作を繰り返し、菌株の単離を行った。単離したコロニーから DNA を抽出・風乾し、滅菌水に溶解して DNA 溶液を得た。

DNA 溶液の一部を用いて 16S rDNA を標的とする PCR 反応を 50ul の反応系で行った。すなわち PCR 用マイクロチューブに HotStarTaq Master Mix (QIAGEN) を 25ul、プライマー 27F および 1492R をそれぞれ 2ul、DNA テンプレート (サンプル DNA 溶液) を 5ul、滅菌水 16ul を分注し、PCR サーマルサイクラー TP400 (タカラバイオ) にセットし 95°C・15 分の activation 後、94°C・1 分 denature、55°C・45 秒 annealing、72°C・1 分 30 秒 extension を 30 サイクル繰り返し、さらに 72°C・10 分の最終伸長反応を行った。アガロースゲル上の電気泳動で期待される塩基長 (約 1400bps) であることを確認した後 WizardSV Gel and PCR Clean-up System (プロメガ) により精製した。精製済み PCR 産物を遺伝子配列決定のため外注先に送付した (シグマ)。得られた遺伝子配列による菌種の推定は NCBI の BLAST 相同性検索を用いて行った。

2-4. 種酢の凍結保存試験

現在ワインヴィネガーは繰り返し回分 (バッチ式) 発酵で試作されており、発酵不良等があると次のヴィネガー製造に支障をきたすことが考えられる。このような事態を回避するため、各ワインヴィネガーの一部を種酢として凍結保存しておくことを検討した。各ワインヴィネガーを下記に示す 5 種類の液体保護培地に 1:1 で混合し、バイアルに入れ、-80°C で凍結保存することにより、その後復元が可能かどうかについて試験を行った。不定期にこれを解凍しその 0.1ml を GYP 白亜寒天培地上に塗沫培養し、クリアゾーンをともなったコロニーを計測した。

- | |
|--|
| ①スキムミルク培地 (1.5%グルタミン酸 Na、5%トレハロース、10%スキムミルク) |
| ②SM1 培地 (3%グルタミン酸 Na、1.5%リビトール、0.05%システイン-塩酸塩、100ml 0.1M リン酸緩衝液 (K-K)) |
| ③20%グリセロール |
| ④40%グリセロール |
| ⑤100%グリセロール |

3. 結果と考察

3-1. 各ヴィネガーの発酵終了時酢酸菌数

W タイプおよび R タイプは 3 サンプル、B タイプは 7 サンプル、I タイプおよび A8 タイプは 4 サンプルの発酵終了時の酢酸菌数を計測し平均値を表 1 に示した。

W タイプ、R タイプおよび I タイプは 10 の 4 乗レベル、B タイプは 10 の 3 乗レベルであった。一方 A8 タイプは 8.5×10^1 cfu/ml とかなり少ない数値を示した。

酢酸菌は酸性条件下で生育可能ではあるが、pH の低下は菌の生育を抑制し、その状態に長期間暴露されると酢

表1 発酵終了時の酢酸菌数 (cfu/ml)

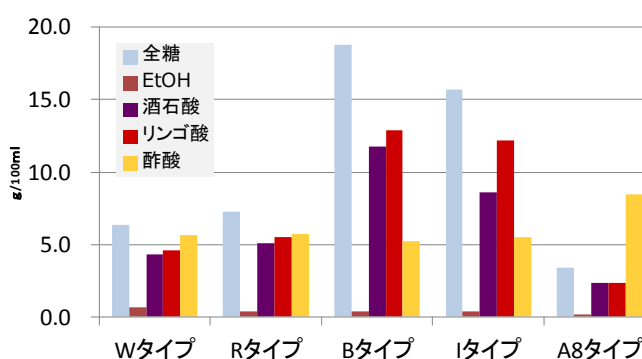
	(cfu/ml)
Wタイプ	1.8×10^4
Rタイプ	1.5×10^4
Bタイプ	3.7×10^3
Iタイプ	2.5×10^4
A8タイプ	8.5×10^1

酸菌とはいえ死滅してしまうことが知られている¹⁾。A8 タイプの酢酸濃度は他の 4 種類のワインヴィネガーより高い (8.4%) もの、ほぼ設計通りに発酵が進んでおり酢酸菌による酢酸発酵自体は正常に行われたことが推察された。A8 タイプの菌数が少なかった理由について、発酵終了時の菌数が減退期に入っており極端に減少している可能性が推察された。あるいは本試験で用いている培養法では A8 タイプ中の酢酸菌をうまく培養できず、コロニーとして検出されていない可能性も考えられた。このため、A8 タイプについては、今後その理由を明らかにし再評価する必要がある。

3-2.各ヴィネガーの糖・エタノール・有機酸分析結果

各ヴィネガーの糖・エタノールおよび有機酸分析を行いその結果をグラフ 1 に示した。

W タイプおよび R タイプ間に大きな差は認められなかった。濃縮果汁を用いている B タイプおよび I タイプは、W タイプおよび R タイプに比べ糖濃度、酒石酸濃度、リンゴ酸濃度が高いという特徴が認められた。



グラフ1 糖・エタノール・有機酸濃度

氷結濃縮された「山幸」のアイスワイン果汁を用いている I タイプは酒石酸濃度が B タイプに比べて若干低かった。

A8 タイプは相対的にブドウ果汁の割合が少なくなる仕込法となっているため、果汁由来の糖・酒石酸・リンゴ酸の濃度が若干低く、酢酸濃度が高くなるという特徴が認められた。

3-3.酢酸菌叢の解析結果

W タイプは 48 株すべて、R タイプは解析不能であった 2 株を除く 46 株が遺伝子配列の一致率 99%以上で *Acetobacter pasteurianus* と推定された。

一般にヴィネガー製造に必要な優良菌種が具備すべき条件として、以下のような性

静置発酵法によるヴィネガー製造における優良菌種が具備すべき条件

1. 光沢のあるちりめん状の菌膜を早く形成するもの。
2. 培養の末期まで健全な皮膜を維持するもの。
3. 酸の生成が早く、発酵終期まで直線的に進むもの。
4. 菌膜を移植した場合、再び菌膜をすばやく形成するもの。
5. 目的の酸濃度まであげうる酸化力のあるもの。
6. できた酢酸を分解しないこと。
7. エタノールがある限り発酵を続け、途中で止まったりすることがないもの。
8. できた酢の香りが良好なもの。
9. 天然の培地によく繁殖するもの。
10. 酢から菌の分離が容易なもの。
11. できた酢は混濁せず濾過・精製が容易なもの。

質が必要であると考えられており²⁾、今回確認された *Acetobacter pasteurianus* は下記に示された多くの条件を満たす優良菌として知られている。従って、今回取得された種菌はワインヴィネガー製造に適した酢酸菌であることが確認された。

また、今回、菌叢解析ができなかった B タイプ、I タイプ、A8 タイプについては、有機酸組成が異なるため、今後はこれらの菌叢解析を行う必要がある。

3-4. 種酢の凍結保存試験

凍結保存試験結果を表 6 に示した。

表2 凍結保存試験

		175	234	274			77	169
保存期間(Days)					保存期間(Days)			
W	スキムミルク	5.5×10^2	4.7×10^2	2.1×10^2	B	スキムミルク	4.1×10^4	2.1×10^4
	SM-1	3.0×10^1	1.0×10^1	1.5×10^1		SM-1	7.6×10^3	4.6×10^3
	20%グリセロール	2.1×10^2	2.3×10^2	3.7×10^2		20%グリセロール	3.2×10^3	1.2×10^3
	40%グリセロール	8.0×10^1	3.0×10^1	3.9×10^2		40%グリセロール	3.6×10^3	1.3×10^3
	100%グリセロール	4.5×10^1	5.0×10^0	6.5×10^1		100%グリセロール	8.6×10^2	5.3×10^2
保存期間(Days)		90	162	188	保存期間(Days)		75	169
R	スキムミルク	4.0×10^3	6.0×10^3	1.7×10^3	I	スキムミルク	1.9×10^4	4.1×10^4
	SM-1	1.2×10^4	4.2×10^3	8.1×10^3		SM-1	3.5×10^3	7.6×10^3
	20%グリセロール	1.2×10^4	1.1×10^4	8.4×10^3		20%グリセロール	1.7×10^3	3.2×10^3
	40%グリセロール	9.0×10^3	1.1×10^4	1.1×10^4		40%グリセロール	1.9×10^3	3.6×10^3
	100%グリセロール	1.1×10^4	1.0×10^4	1.3×10^4		100%グリセロール	9.7×10^2	8.6×10^2
		(cfu/ml)			保存期間(Days)		50	
A8	スキムミルク				A8	スキムミルク	0	
	SM-1					SM-1	0	
	20%グリセロール					20%グリセロール	0	
	40%グリセロール					40%グリセロール	0	
	100%グリセロール					100%グリセロール	0	

W タイプは 274 日後に GYP 白亜寒天培地上で酢酸菌が 1ml あたり 10^2 のレベルの復元が確認された。R タイプは最長で 188 日間、 10^4 のレベルの復元が確認された。B タイプおよび I タイプは最長で 169 日間、 10^4 のレベルの復元が確認された。

W タイプは R タイプ・B タイプ・I タイプと比較して菌数レベルがやや低くなっているが、これらのタイプは全て、保存期間を通じてほぼ同レベルを保っており、少なくとも半年間程度は -80°C で凍結保存が可能であることが示唆された。しかし、A8 タイプは保存期間が 50 日と短いにもかかわらず、復元が確認できなかった。原因は不明だが、発酵終了時の酢酸菌数が少なかった結果からも酢酸濃度の高さが要因のひとつである可能性が推察され、今後、A8 タイプを復元する方法あるいは増菌して保存する方法を検討することが課題である。

保護培地間に明確な差は認められなかった。スキムミルク培地は B タイプと I タイプで最も復元菌数が多くなった。40%グリセロールは W タイプで最も復元菌数が多くなった。100%グリセロールは R タイプ 188 日後の復元において最も菌数が多くなったが、その他の場合では酢酸菌の保護効果は低かった。SM-1 培地と 20%グリセロールの保護効果は高いとは言えない結果であった。以上の結果から 40%グリセロールとスキムミルク培地が有望であると考えられた。

4.まとめ

池田町ブドウ・ブドウ酒研究所と食品加工技術センターは共同研究を行い、ワイン醸造では歓迎されない酢酸菌を利用して種酢を調製し、池田町の特産品であるワインとブドウ果汁のみを原料とした本格的なヴィネガーの開発について検討した。

食品加工技術センターは池田町ブドウ・ブドウ酒研究所のワインヴィネガー製造法確立を支援するため、ワインヴィネガー発酵に資する酢酸菌叢の解析・同定および種酢の保存方法に関する条件の検討を行った。

試作された 5 種類のワインヴィネガーについて、発酵終了時の酢酸菌数測定を行なった結果、W・R・B・I の各タイプの酢酸菌数は 10 の 3~4 乗レベルであり、A8 タイプは 10 の 1 乗レベルとかなり低い数値を示した。今後、A8 タイプについては安定したヴィネガー製造の観点から、この理由を明らかにする必要があると考えられた。

また、5 種類のワインヴィネガーの分析結果は、W タイプおよび R タイプの酢酸濃度に大きな差はなかった。これに対して、B タイプおよび I タイプは濃縮果汁由来と推察される糖、酒石酸、リンゴ酸濃度が高かった。さらに A8 タイプは原料のアルコール度数が高く、ブドウ果汁の配合割合が少ないため、酢酸濃度が高く、糖、酒石酸、リンゴ酸が若干低いという特徴が認められた。各ワインヴィネガーが持つ独特のキャラクター（色調・香・甘味・酸味等）を活かすことにより、互いに埋没しない製品作りが期待された。

これらのワインヴィネガーのうち、W タイプおよび R タイプから分離した酢酸菌 48 株および 46 株の遺伝子解析を行った結果、ヴィネガー製造における表面発酵酢酸菌の優良菌種として知られている *Acetobacter pasteurianus* と推定され、本試験において取得された種菌はワインヴィネガー製造に適した酢酸菌であることが確認された。また、菌叢が明らかになることによって異種酢酸菌汚染の判断や当該菌種の特性を理解した上での発酵管理に役立つことが期待された。

今後は、ワインヴィネガー中の有機酸組成が異なる B タイプおよび I タイプについても酢酸菌を分離し、遺伝子解析による菌叢解析と菌種の同定を行う予定である。

さらに、種酢の保存試験については、ワインヴィネガーと液体保護培地の混合凍結保存試験の結果、W タイプは約 9 ヶ月後、R タイプ・B タイプ・I タイプは約 6 ヶ月後まで GYP 白亜寒天培地上での復元を確認した。しかし、酢酸濃度が高い A8 タイプは比較的短い 50 日保存後で復元が確認できなかった。このため、A8 タイプについてはさらなる保存方法の検討が必要であった。培地の組成による差については、5 種類の保護培地間に明確な差は認められなかった。現時点で保護培地を一つに絞ることは出来ないが、40%グリセロール、スキムミルク培地は保護効果が高い傾向が認められた。

5. 今後の予定

有機酸組成および糖濃度が R タイプ、W タイプと異なる B タイプ、I タイプ、A8 タ

イブの酢酸菌叢解析を行うとともに、A8 タイプの発酵終了時の酢酸菌数の確認と凍結保存法の確立を中心に研究を進める。

7. 参考文献

- 1) 松下 一信：好気呼吸による「発酵」を行う酢酸菌－生物学基礎講座バイオよもやま話－『生物工学会誌』 Vol. 90 No. 6 P340-343 (2012)
- 2) 正井 博之：食酢醸造微生物学の進歩 (1)－『日本醸造協会雑誌』 Vol. 79 No. 6 P 403-408(1984)