

## 池田町特産品を用いた加工食品の開発 第二報

公益財団法人とかち財団 四宮 紀之  
共同研究：池田町ブドウ・ブドウ酒研究所 齋藤良市 大淵秀樹

### 1. 目的および概要

近年、食や健康に対する意識の高まりもあり、食酢に根強い人気があるのはよく知られている。また食品に対する嗜好性の多様化もありワインヴィネガールの消費量は増加傾向である。本試験においては北国のワインの特徴でもある、豊かな酸味を活かした十勝ワインと池田町産ブドウ果汁のみを原料とした本格的なヴィネガールの製造法の確立を目的としている。

ヴィネガー製造法の検討については池田町ブドウ・ブドウ酒研究所が行い、当財団はヴィネガー製造の側面的支援としてワインヴィネガー発酵に資する酢酸菌の同定とその保存法に関する検討を行った。

前年度は製造用種酢の菌数計測、赤ワインヴィネガー白ワインヴィネガー菌叢解析、バックアップ用種酢保存法の検討および試作ヴィネガールの成分分析を行った。

今年度は高酸度タイプヴィネガールの菌数計測、バルサミコタイプヴィネガー、高酸度タイプヴィネガー菌叢解析、軟寒天培地保存法、試作品および製品評価のための成分分析を行ったので報告する。



写真：製品化された  
十勝ワインヴィネガー

### 2. 試験方法

#### (1) 試料

本試験において用いた5種のワインヴィネガーは赤ワインヴィネガー（以下Rとする）、白ワインヴィネガー（以下Wとする）、バルサミコタイプヴィネガー（以下Bとする）、アイスワイン果汁ヴィネガー（以下Iとする）、高酸度タイプヴィネガー（以下A8とする）であり、池田町ブドウ・ブドウ酒研究所で製造されたものおよび一部とかち財団で試作したものをを用いた。

#### (2) 酢酸菌数計測

発酵管理の観点から発酵菌数の把握は重要と考えられる。前年度発酵菌数が10の1乗レベルと低かったA8について試作を行い、発酵途中の酢酸菌数を計測した。各試作方法、分析条件は次のとおりである。

##### ①A8タイプの試作

池田町ブドウ・ブドウ酒研究所より提供されたワイン（YS'12）、ブドウ果汁、A8タ

イブ種酢を混合し、酢酸度 1.7%前後、アルコール度数 8%以上になるように調製し、これを数本の三角フラスコに分注した。

#### ②酢酸菌数計測

発酵途中の酢酸菌数を計測するため、三角フラスコのうち一本を酢酸度測定用とし菌膜を壊さないように酢酸度をモニターしつつ、適宜別の三角フラスコを振り混ぜ菌膜を落とし十分に攪拌し 0.1ml を分取し前年度同様 GYP 白垂寒天培地に塗抹した。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測した。

#### (3) 酢酸菌叢の解析

発酵終了直後の B および A8 のコロニーから前年度と同様の方法で DNA を抽出し、PCR 法により PCR 産物を得た。遺伝子配列の決定は外注（シグマアルドリッチジャパン）により行い、菌種の推定は NCBI(National Center of Biotechnology Information) の BLAST 相同性検索を用いて行った。

#### (4) 種酢の軟寒天培地保存試験

現在ワインヴィネガーは繰返し回分（バッチ式）発酵で製造されていることから、発酵不良等があると種酢が確保できず次のヴィネガー製造に支障をきたす可能性がある。このようなリスクを低減するため、前年度はバックアップ用種酢の凍結保存法を検討した。単一の保存方法では機器の故障等によりバックアップ用種酢を失うリスクが大きいため、今年度は軟寒天培地による冷蔵保存を行いその後復元が可能かどうかについて試験を行った。すなわち保存 45、90、135、180、270 日後に軟寒天培地全てを液体培地に接種し 30℃・72～96 時間培養後、酢酸菌膜の有無と酢酸濃度の定量により復元を確認した。

#### (5) 試作品および製品の化学分析

各試作ヴィネガーの特性を把握するため前年度は糖、有機酸、エタノール分析を行った。今年度は遊離アミノ酸組成分析を行った。

さらに今年度は R タイプ、W タイプが製品化された。その特性を明確にするためアミノ酸、糖、有機酸分析を行い、市販白ワインヴィネガーおよび市販穀物酢との比較を行った。

##### ①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。

##### ②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。

##### ③アミノ酸分析

ワインヴィネガー中の遊離アミノ酸については高速液体クロマトグラフを用いて、PTC 誘導体化法により測定した。

### 3. 結果および考察

#### (1) 各ヴィネガーの発酵終了時酢酸菌数

A8 タイプを2回試作し、酢酸度をモニターしながら酢酸菌数を計測した。

結果を表1に示した。参考のため前年度の結果を表2に示した。

1回目の試作したA8タイプでは酢酸度5.5%の時はコロニー数が多すぎ計数不能であった。酢酸度7.1%時は $1.3 \times 10^6$ cfu/ml、7.2%時は $1.3 \times 10^6$ cfu/mlであった。2回目の試作では酢酸度7.3%時 $3.2 \times 10^6$ cfu/ml、8.7%時 $3.8 \times 10^6$ cfu/mlとほぼ同様なレベルで発酵菌数としては問題のない状態と考えられた。最高酢酸度に達した後さらに5日後の酢酸菌数は0であった。これらの結果からA8タイプの酢酸菌数は発酵途中十分な菌数に達するものの、酢酸度が高まった後は速やかに菌数が減少しているものと推察された。ブドウ・ブドウ酒研究所における試作でも問題なく繰返し回分発酵が続いていることからA8タイプは他のヴィネガーと異なりより少ない菌数で発酵継続が可能であると考えられた。サンプリング時期に注意が必要ではあるが、各タイプ発酵終了時菌数目安を把握できたものと考えられた。

#### (2) 酢酸菌叢の解析結果

表1 A8タイプ発酵途中および発酵終了時酢酸菌数

日付	1月8日	1月9日	1月13日	1月16日	1月18日	1月22日
1回目 酢酸度 (%)	1.8	1.74	3.5	5.57	7.1	7.2
1回目 菌数 (cfu/ml)	-	-	-	TNTC	$1.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$

日付	2月2日	2月4日	2月6日	2月9日	2月10日	2月13日	2月18日
2回目 酢酸度 (%)	1.61	1.59	2.02	7.33	8.78	8.84	8.78
2回目 菌数 (cfu/ml)	-	-	-	$3.2 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	-	0

表2 発酵終了時の酢酸菌数

	標本数	平均酢酸菌数 (cfu/ml)
白ワインヴィネガー(W)	3	$1.8 \times 10^4$
赤ワインヴィネガー(R)	3	$1.5 \times 10^4$
バルサミコタイプ(B)	7	$3.7 \times 10^3$
アイスワイン果汁ヴィネガー(I)	4	$2.5 \times 10^4$
高酸度タイプ(A8)	4	$8.5 \times 10^1$

BタイプおよびA8タイプからそれぞれ48株を釣菌し、遺伝子解析を行った結果を表3に示した。

表に示すとおり、Bタイプ、A8タイプともに48株すべて遺伝子配列の一致率99%以上で*Acetobacter pasteurianus*と推定された。前年度解析を行ったRタイプWタイプもともに*Acetobacter pasteurianus*と推定されており、これで4種類のヴィネガー

一の酢酸菌は共通しており、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。

十勝ワインから最初に作られたヴィネガーである R タイプをもとにそれぞれの原料に合わせて馴致しながら他の 3 種のヴィネガー製造を行ってきているが、原料の違いにより異なる菌叢を示す可能性も考えられたが、今回の解析でそれは否定された。菌叢が共通しているという解析結果から、最低限 R タイプ種酢を保存しておけば他の 3 種のヴィネガーが復元可能であることが示唆された。

### (3) 種酢の軟寒天培地保存試験

軟寒天培地保存試験結果を表 4 および表 5 に示した。

R、W、B、A8 タイプ全て 45 日保存後から 270 日保存後まで全期間復元用液体培地

表3 遺伝子解析結果

バルサミコタイプヴィネガー(B)由来酢酸菌遺伝子解析結果					
菌株	推定される菌種	%一致率	菌株	推定される菌種	%一致率
B12-3	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-35	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-4	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-36	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-10	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-38	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-12	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-39	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-15	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-41	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-16	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-43	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-17	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-45	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-19	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-46	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-47	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-2	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-49	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-6	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-50	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-21	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-51	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-22	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-52	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-25	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-53	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-27	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-54	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-28	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-55	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-9	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-56	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-11	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-57	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-14	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-58	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-69	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-59	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-30	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-60	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-71	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-61	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-72	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-62	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
B12-73	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	B12-63	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
高酸度タイプヴィネガー(A8)由来酢酸菌遺伝子解析結果					
菌株	推定される菌種	%一致率	菌株	推定される菌種	%一致率
A8-6-1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-26	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-2	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-27	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-3	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-28	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-4	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-29	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-5	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-30	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-6	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-31	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-7	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-32	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-8	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-33	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-9	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-34	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-10	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-36	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-11	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-37	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-12	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-38	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-13	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-40	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-14	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-41	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-15	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-42	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-16	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-43	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-18	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-44	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-19	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-45	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-20	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-46	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-21	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-47	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-22	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-48	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-23	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-49	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-24	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-50	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99
A8-6-25	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99	A8-6-51	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	99

で酢酸菌の特徴的な菌膜を確認した。合わせて復元用液体培地の分析も実施し酢酸の生成も確認した。

表4 冷蔵保存後復元の可否

	45D	90D	135D	180D	270D
R	○	○	○	○	○
W	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○
A8	○	○	○	○	○

表5 復元培地中残留アルコールおよび酢酸濃度(g/100ml)

(270D)	アルコール	酢酸
R	0.01	1.1
W	0.01	1.38
B	0.1	1.57
A8	0.01	1.39

ディープフリーザーといった特殊な装置を用いることなしに種酢を保存可能なため、高層の軟寒天培地を作成可能であればとち財団食品加工技術センターとブドウ・ブドウ酒研究所の複数箇所においても保存が可能となるメリットがある。-80℃凍結保存法だけでは、機器故障・停電といったアクシデントがあると種酢を失いヴィネガー製造が中断するリスクが大きいですが、本法を併用することによりそのリスクをかなり小さくすることが可能となったと考えられる。加えて凍結保存法では復元が確認できなかったA8タイプも270日後の復元が確認できたことはバックアップ用種酢の安定した保存という点では大きなメリットをもたらすものと考えられた。

種酢の保存については継続中であり、-80℃凍結保存法・軟寒天培地冷蔵保存法ともに一応のめどとして1年間の保存が可能か検討する予定である。

#### (4) 各ヴィネガー試作品の化学分析結果および製品ヴィネガーと市販品との比較

前年度行った各ヴィネガー試作品の主な化学分析結果を図1に示した。

今年度分析した遊離アミノ酸濃度を図2に示した。氷結濃縮果汁を用いたIタイプの

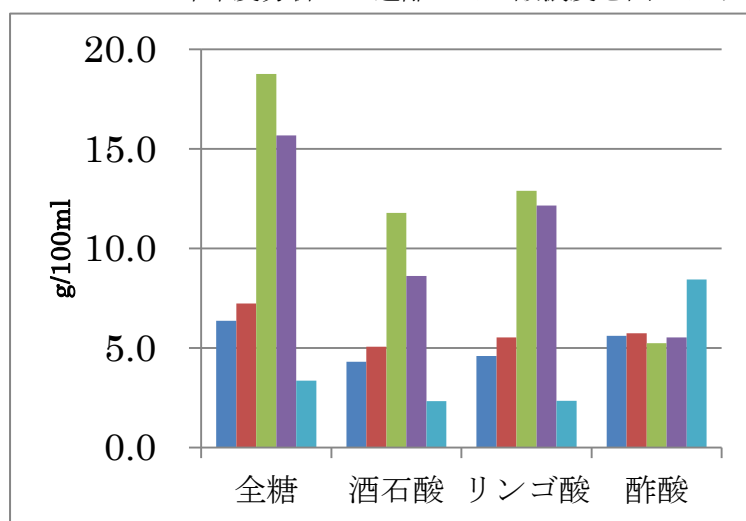


図1 試作ヴィネガー化学分析 (前年度)

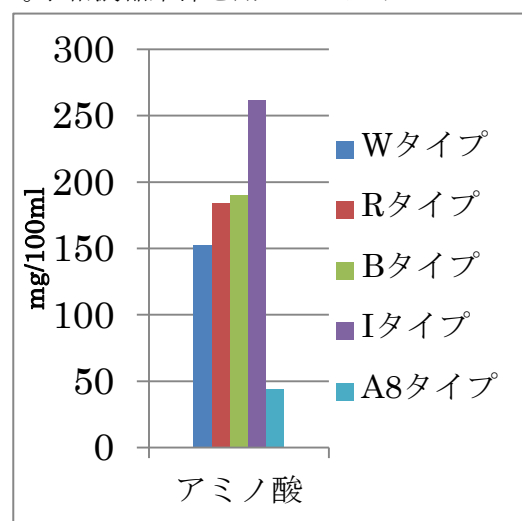


図2 試作ヴィネガーアミノ酸分析

濃度は約260mg/100mlと他の4種に比べて多かった。Iタイプに用いる果汁はブドウ果樹に着いたまま果実を冬期間自然状態で濃縮させていく過程を経ることが一要因と

推察される。Wタイプ、RタイプおよびBタイプのアミノ酸濃度は150~190mg/100mlであり、大きな差は認められなかった。A8タイプは43 mg/100mlと低い濃度であった。他の4種より高アルコール、高酸度という過酷な環境下で酢酸菌が生育するためにアミノ酸を資化した可能性が考えられた。

Rタイプ、Wタイプは果汁由来成分がバランスよく残り、アミノ酸は中程度であった。濃縮果汁を用いるBタイプ、Iタイプは果汁由来の成分が多く、アミノ酸濃度はBタイプが中程度、Iタイプは若干多かった。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、果汁由来成分が若干低く酢酸濃度は高くアミノ酸はかなり少ないという特徴が認められた。

製品化されたRタイプ、Wタイプの化学分析を行い市販白ワインヴィネガー、市販穀物酢と比較した(表6)。今年度製品化されたR、Wタイプは市販白ワインヴィネガー

表6 製品ヴィネガーと市販品 分析値比較

	g/100ml,アミノ酸はmg/100ml			
	R	W	市販白	市販穀物酢
フルクトース	3.0	4.4	1.3	0.0
グルコース	2.9	3.2	0.9	2.0
酒石酸	3.97	4.18	1.52	2.96
リンゴ酸	4.15	6.11	1.76	0.09
酢酸	5.68	5.79	4.83	4.16
アミノ酸	183.90	152.40	47.70	12.40

ーに比べ糖含量は2~3倍多く、酒石酸・リンゴ酸・コハク酸も2~4倍程度の含量であった。アミノ酸総量は市販品に比べ3~4倍程度多かった。糖含量が多いためとがった酸味が抑えられ、有機酸含量の多さ、複雑さ、アミノ酸含量の多さが豊かな酸味・風味に大きく寄与していることが示唆された。製品と市販品との差異は、発酵法と市販品原料である原料アルコールおよび希釈に用いられたと推察される水の影響が推察された。十勝産原料100%の本格的ヴィネガーの優位性を示すことに貢献できたものと考えられた。

#### 4. まとめ

池田町ブドウ・ブドウ酒研究所が行っているワインヴィネガー製造法の確立を側面的に支援するため以下の項目に関して検討を行った。

試作された5種類のワインヴィネガーについて、発酵管理の目安とし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。しかし発酵途中の菌数は10の6乗レベルであり発酵菌数としては問題ないものと考えられた。酢酸度が高まった後は速やかに菌数が減るものの、ブドウ・ブドウ酒研究所におけるA8タイプの製造も問題なく継続していることから、A8タイプの発酵終了時の菌数目安としては10の1乗レベルは妥当と考えられた。

BタイプおよびA8タイプから分離した酢酸菌それぞれ48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* と推定された。前年度解析されたR、Wタイプも全て同一の菌種であることが分かっており、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、4種のヴィネガーが同一の菌叢であることが明らかになることによって、十勝ワインから最初に作られたRタイプを最低限保存しておけばW、B、A8タイプへ復元していくことが可能であることが示唆された。今後保存菌株の簡略化等を検討する際には有益な情報であるとともに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る。

バックアップ用種酢の保存を行うため前年度は-80℃凍結保存法を検討した。今年度は、種酢を失うリスクをより低下させるために、より温和な条件の軟寒天培地冷蔵保存法を検討した。R、W、B、A8タイプ全て270日の冷蔵保存後復元可能であることが確認された。これによりバックアップ用種酢を2種類の方法により保存が可能となり、種酢を失い製造が滞るリスクを大きく低下させることができたと考えられる。また凍結保存法では保存が確認できなかったA8タイプを保存できるようになったことは大きな前進と言える。

5種類のワインヴィネガー試作品の化学分析を行った。Wタイプ、Rタイプは糖・酒石酸・リンゴ酸・酢酸はおおよそ5g/100ml程度でありアミノ酸は150mg/100ml前後であった。Bタイプ、Iタイプは濃縮果汁由来である糖、酒石酸、リンゴ酸濃度が高かった。アミノ酸含量はBタイプがW、Rタイプとほぼ同程度であり、Iタイプは260mg/100mlと最も高い値であった。A8タイプはブドウ果汁の配合割合が少ないため、酢酸含量が高く、糖、酒石酸、リンゴ酸が若干低いという特徴が認められた。アミノ酸含量は43mg/100mlと最も少ない結果となった。これにより大まかに各試作ヴィネガーのキャラクターが把握された。

今年度製品化されたR、Wタイプは市販白ワインヴィネガーに比べアミノ酸総量で3~4倍程度多く、糖含量も2~3倍多く、酒石酸・リンゴ酸・コハク酸も2~4倍程度の含量であった。この結果は製品Rタイプ、Wタイプの豊かな風味を裏付けるものと考えられた。市販品との差異は、発酵法と原料の影響が示唆された。これらの研究により、十勝産原料100%の本格的ヴィネガーの製造に大きく貢献できたものと考えられた。