

身近で活躍する有用微生物 食品と有用微生物－和食文化と微生物7

食酢と微生物

た やま けん じ
多 山 賢 二
Kenji TAYAMA

はじめに

人類最古の発酵調味料とされる食酢は、和食のみならず、西洋料理や中華料理にも決して欠くことのできないものとなっている。また、各世代を超えて日本人が好むメニューとしては、寿司が常にトップクラスに位置し、食酢の消費量は比較的安定している。この食酢に関連する微生物や食酢の発酵に直接関与する酢酸菌の酵素について、詳しい研究が始まったのは1977年頃であり、日本の研究者の貢献度も大きい。今回の解説はこれまでの40年近くの研究を総括する形にもなっていることを付け加えておきたい。

I. 食酢とは

1. 食酢のマッピングと存在価値

果汁などの糖類もしくはデンプンを糖化した液を酵母によってアルコール発酵させたもの、あるいは醸造用アルコールを、酢酸菌を用いて酢酸発酵させた液体調味料が醸造酢であり、食品添加物の酢酸をベースにブレンドによってのみ製造された合成酢とは明確に区別されるものの、共に食酢と定義されている。合成酢が今の時代でも生き残っているのは不思議だが、弁当用小袋ソースの原材料など業務用で使用されているようである。食酢は「もろみ酢」とは製法も成分も明確に異なり、全くの別物である点に注意したい¹⁾。食酢の分類は主原料を基準として行われており、穀物酢、果実酢などに分類されている。それぞれの特徴ある香味は、原料に起因するこ

とが少なくないため、香味の視点で分類・マッピングを行ってみると違いがよくわかる(図1)。なお、マヨネーズやケチャップ等の原料加工用として使用されている高酸度醸造酢(ホワイトビネガーなど)は主に業務用として広く用いられているため、家庭用としての販売は、ほとんどない。

一方で、すべての食酢に共通する特徴的主成分は「酢酸」である。酸味以外の味がほとんどなく、不揮発性のためツンとこない有機酸は多くあり、食酢に代わる調味料が広がらない状況は不可解ではあった。これを説明するヒトでの嗜好傾向が、寿司飯や酢の物などを対象に調べられ、酸味度を揃えた各種有機酸の精製品を用いての評価結果は、納得できるものであった(図2)。すなわち、寿司飯、酢の物、ぼん酢醤油では、酢酸をベースとした味付けが最も好まれた一方で、ジュースやヨーグルトでは、酢酸による酸味は最も嫌われた²⁾。このように、食経験の影響が大きいことが明白となり、幼少の頃からの食習慣を大きく変えない限り、食酢の存在価値が消失することはないと認識できた。

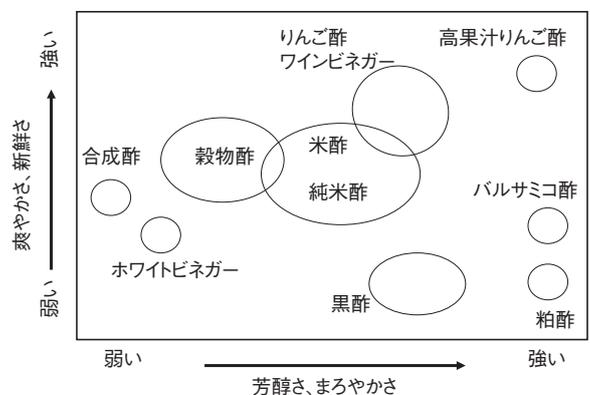


図1 香味による各食酢のマッピング¹⁾

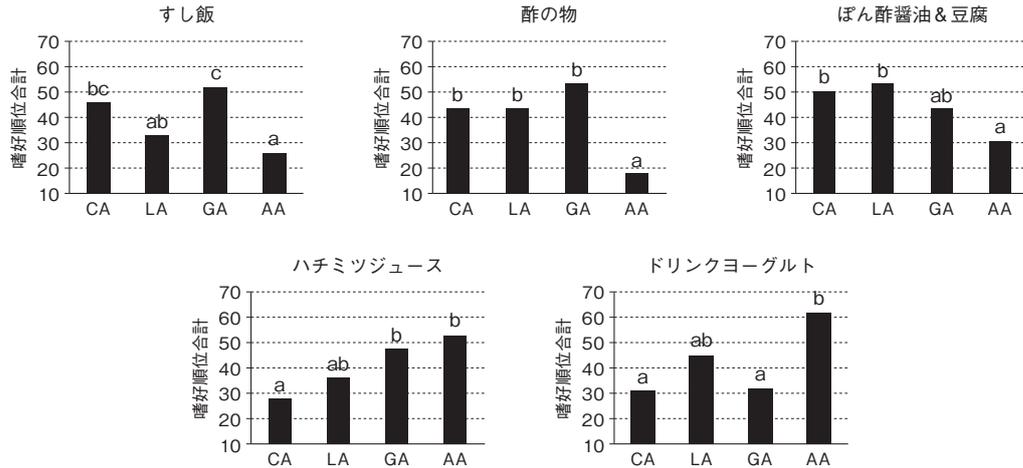


図2 各種有機酸を用いた調理品における嗜好²⁾

CA;クエン酸、LA;乳酸、GA;グルコン酸、AA;酢酸。グラフ上の記号は同一のアルファベットを持たない場合に相互に有意差 ($p < 0.05$) が存在。嗜好順位合計は数値が低いほど好まれたことを意味。

2. 食酢の機能

表1の食酢の機能とは、原料に由来しないものであって、酢酸の機能と判断できるものとして示した。詳細は総説³⁾や成書¹⁾にわかりやすく説明されている。これらの機能の中で、微生物との関わりという視点で見た場合、静菌・殺菌作用が最も注目される。一般に、カビは細菌と異なり酸性 (pH5前後) を好んで生育する。このカビの増殖を抑制するためには、食酢と食塩の併用が効果的である。図3では、やや酸っぱめに感じるが十分に美味しいと思われる寿司飯 (図3のA) であれば、温かい場所で5日間放置しても、カビの増殖が完全に抑えられることが示されている。食中毒細菌を対象とした実験では、芽胞を形成する細菌 (セレウス菌など) を除けば、短時間で希釈食酢 (2.5%酢酸) によって殺菌が可能で、食塩との併用によって効果が一層高まる (表2)。食酢に含まれる酢酸の濃度は、一部のバルサミコ酢を除けば4%前後であるため¹⁾、いつでも安価に購入できる食酢を微生物制御に一層有効活用することが望まれる。

このような殺菌作用を有する酢酸が存在していても酢酸菌は増殖可能であり、酢酸存在下でさえも、液中にエタノールが含まれていれば、それを優先して酢酸に変換することは、中性付近の培地を用いて細菌を培養し実験している研究者にとって驚きであ

ろう。酢酸耐性機構は、後述するように多くの蛋白が関与している。

II. 食酢の製法と微生物

1. 壺を用いた古い製造法および関与する微生物

2002年頃までは、黒酢というと、壺の中に蒸した玄米と米麴を仕込み、半年以上の長い期間、原則静置して発酵させる「色が比較的濃い米酢」との印象が強かった。この製法は古く、約180年の歴史があるとされる⁵⁾。現在では、黒酢の詳しい製造工程の規定はされないまま、原料 (種類、使用量) が基準化され、これに該当した褐色の製品が黒酢 (米黒酢・大麦黒酢) と定義されている。

円谷らは今から30年前になるが、現在も壺を用い、そのまま製法が受け継がれて鹿児島県福山町周辺で製造されている福山米酢 (現在の黒酢) の製造工程を詳細に解析した⁵⁾。その結果、図4に示されるように、デンプンやタンパク質を含有する玄米の分解、エタノールの生成、そして酢酸の生成・蓄積が実に巧みに順序よく行われていることが明らかとなった。また、菌叢解析の結果、カビ、酵母、乳酸菌および酢酸菌が、役割分担していることも示された (図5)。各壺に住み着いている微生物として、酵母は *Saccharomyces cerevisiae*、*Zygosaccharomyces*

表1 食酢(酢酸)の機能

作用	期待できる効果
静菌・殺菌作用	食中毒予防
食材の酸性化	食材の軟化促進、骨との分離促進、色の保持、Ca・Mgの溶出促進、還元型VitCの保護、魚臭さ緩和
疎水性物質の乳化作用	油の均一化による美味しさ向上
酸味付与	唾液分泌促進(夏場の食欲増進、口腔衛生向上)、味の増強(減塩効果)
胃のPGE ₂ 増大	胃粘膜保護、胃潰瘍予防
胃液分泌促進	消化促進
カルシウム吸収促進	骨粗しょう症予防
骨形成促進作用	〃
グルコース吸収遅延	糖尿病予防
インスリン感受性向上	〃
肝臓でのAMPK活性化	〃
肝臓・筋肉のグリコーゲン再補充促進	肉体疲労時の回復促進
運動後の血中乳酸増加抑制	〃
血管拡張作用(アデノシン生成)	高血圧予防
RAA系の抑制	〃
肝臓での脂肪合成抑制・ β 酸化促進	脂質異常症予防
肝臓でのPPAR α 活性化など	肥満予防

Ca; カルシウム、Mg; マグネシウム、VitC; ビタミンC、PGE₂; プロスタグランジンE₂、AMPK; AMP活性化プロテインキナーゼ、RAA系; レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、PPAR α ; 糖質・脂質代謝などに深く関与している転写調節因子

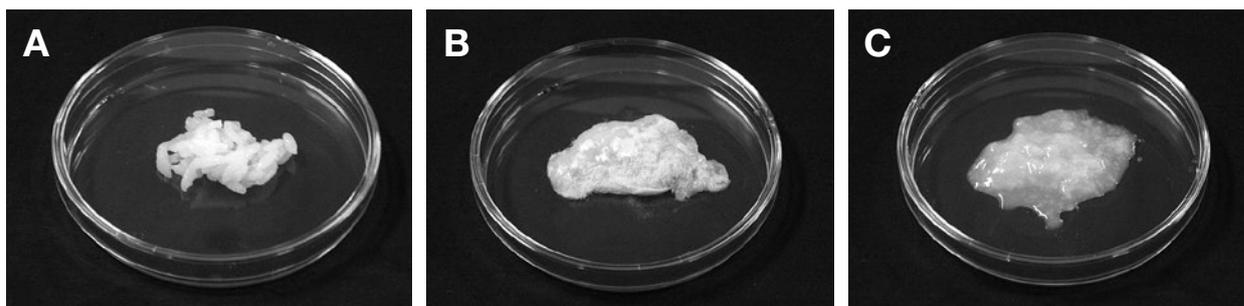


図3 合わせ酢使用量の異なる寿司飯でのカビ増殖による液化

文献2) に示された方法で寿司飯を作成し、種麹を接種後、30℃にて5日間、ビニール袋中で、酸素の供給および水分の蒸発に注意しながら放置したものがA。合わせ酢量が、これの1/2量がB、1/4量がC。写真は、各々を無菌シャーレに移して直ちに撮影したもの。Aでは麹菌の増殖が全く認められず米粒一つ一つが識別可能だが、Cでは増殖した結果、米の液化が進み、ドロドロの状態になっている。20名以上の学生による寿司飯の官能評価(嗜好)では、AおよびBが、Cと比較して有意に好まれたが、AとBでは有意差は認められなかった結果が得られている。

表2 食酢(酢酸)の殺菌作用⁴⁾

菌 株	殺菌に要する時間*(分, 30℃)	
	食酢	二杯酢
<i>Escherichia coli</i> O157 : H7 NGY-10	150	10
<i>E. coli</i> O26 : H11 NGU-9688	150	10
<i>E. coli</i> O111 : K58 : H ⁻	60	1
<i>Citrobacter freundii</i> IID 976	10	5
<i>Salmonella enteritidis</i> IID 604	10	5
<i>S. typhimurium</i> s3035	10	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210001	< 0.25	< 0.25
<i>Aeromonas hydrophila</i> IFO 3820	< 0.25	< 0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IID 1031	1	< 0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3060	10	10
<i>Enterococcus faecalis</i> IID 682	360	30
<i>Bacillus cereus</i> IFO 13597	> 240	> 240

食酢; 2.5%酢酸、二杯酢; 2.5%酢酸 + 3.5%塩化ナトリウム

*; 生菌数を1/1000に減少させるのに要する時間

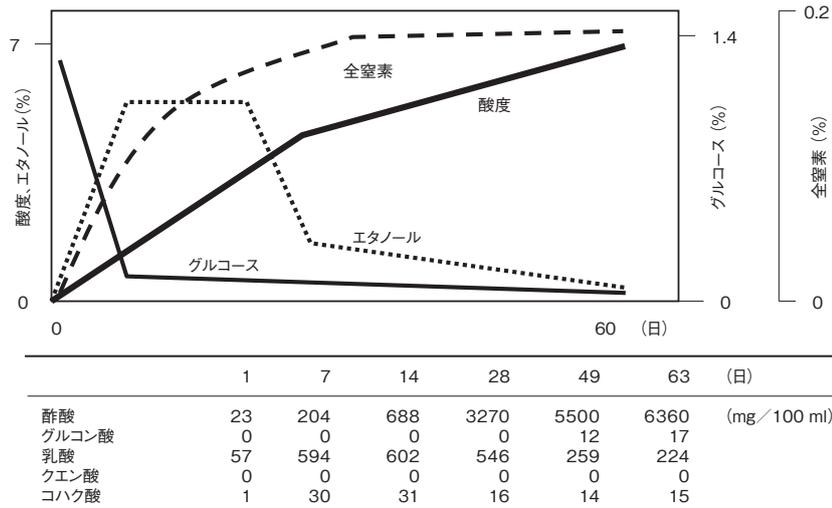


図4 壺酢発酵中の主な成分変化
(文献5)より引用)

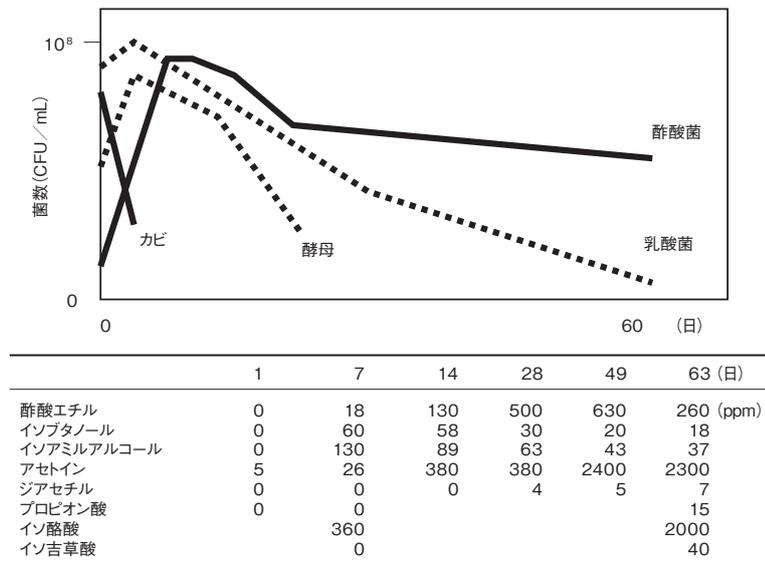


図5 壺酢発酵中の菌叢および香気成分の変化
(文献5)より引用)

bailii, *Candida krusei*, *C. famata*, 乳酸菌は *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, 酢酸菌は *Acetobacter pasteurianus* に加えて *A. aceti* および *A. xylinum* であった。伝統を受け継いでいるため、壺酢の菌叢は現在でも同様と考えられる。

2. 現在の大量製造法とそれに用いられる酢酸菌以外の微生物

和食で用いられることが多い米酢を例に、大量生産される場合の製法を図6に示した。用いる麴は、

分解酵素として使用する目的であることから、米麴の代わりに市販の酵素剤(アミラーゼ類)を用いることもあり、また、アミノ酸をより多く溶出させるためプロテアーゼを追加使用することもある。麴菌としては *Aspergillus oryzae* が用いられる。その理由は、蒸米によく生育し、増殖速度が速く、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼの各活性を十分に保有しているためである。

酵母としては、当然エタノール生成能やエタノール耐性が高い株が必要であるため、*Saccharomyces*

cerevisiae に絞られることにはなる。しかし、同じ米糖化液のアルコール発酵であっても、パン酵母、清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母など種類が異なると、*n*-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコールの濃度およびその比率も変わることがわかっており、特に酢酸菌によって酸化されると微量でも不快感を高めるイソアミルアルコールが、市販清酒酵母によって比較的多く蓄積される例もあり、酵母の種類の変更は、香りの品質向上で有効な場合がある。香りの爽やかさを高めるために、醸造用アルコール（ほとんどがエタノール）を原材料として用いる穀物酢や米酢も市販されており、製品価格も抑えられているため人気が高い。食酢の原料はお酒であるとの認識から、良いお酒造りが良い食酢に繋がるとの広告・PRがなされる場合があるが、上記の事例もあることから、科学的根拠を消費者は確認する必要がある。

図6には示していないが、酢酸菌による酢酸発酵を終えた後、数週間から数カ月の熟成を経て、製品化（瓶詰）される。食酢は安価な発酵調味料であり、多少の香りの問題はあっても、酸っぱければ調理上支障ないという理由もあってか、以前は品質面での管理は厳密なものではなかった。現在では改善されてきているが、製造工程中で不良菌と認定される微生物が生育し、それによって好ましくないと判定される臭いが強まることもある。この不快臭発生の仕組みを図7にまとめた。香りの面で優れた製品を作り出すためには、この図で示した汚染微生物は排除する必要がある、クリーン化をベースとした製造工程や環境の改良・改善に企業が投資できるか否かにかかっている。

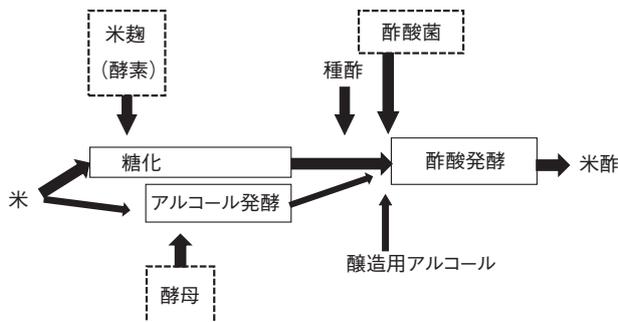


図6 米酢の製造方法

3. 現在の大量製造法において関与する有用酢酸菌

1) 食酢発酵醪に存在する有用酢酸菌

壺を用いた製法では、個々の壺の菌叢が一定ではないために、米酢品質にバラツキが生じ、実際、(1) 液の混濁、(2) 発酵の途中停止、(3) 酢酸の減少、(4) 異臭の発生が観察されている⁵⁾。従って多くのロットを混合するなど、製造の最終工程において苦労が少なくない。そこで、現在では壺や容器内に住み着いた微生物を利用する方法ではなく、優良な発酵を行った酢酸菌(群)を次の発酵に使用し、清潔な大型容器を準備し、仕込液や配管を十分に殺菌・洗浄することで、大量生産での品質の安定化と高い収量を得ている。しかし、乳発酵製品のように、単一菌の純粋培養系のレベルにまで至っていないのが食酢業界の実態である。これは製造設備コストの抑制に加え、純粋培養系がもたらすリスクを回避し、長期に亘って安定した酢酸発酵が維持できるようにするためでもある。例えば、静置発酵の場合、夏場は菌膜表面が40℃を超えるが⁶⁾、この高温に耐えて酢酸を生成し、主要発酵菌のチリメン菌（絹布のチリメンのような光沢を持った菌膜を形成する酢酸菌：*A. pasteurianus*）を支えている酢酸菌として、後述する「混濁性菌」(*A. aceti*)を挙げることができ、また、発酵後期の酢酸濃度が高く、チリメン菌にとっては非常に苦しい時期では、酢酸耐性に優れた「厚膜形成菌」(*Gluconacetobacter. xylinus* (= *A. xylinum*))が酢酸濃度の上昇を支えている。この *Ga. xylinus* は

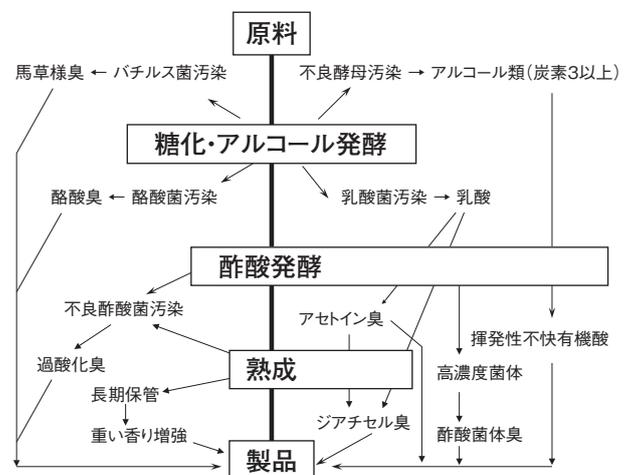


図7 食酢製造工程中の微生物汚染を中心とした香りの劣化の仕組み¹⁾

不良菌との見方もあるが、取り巻く環境次第で有用菌と考えることができる。

図8に菌膜や厚膜の様子を示し、図9では米酢の静置発酵中の菌叢の変化を示した。ただし、原料

の種類や製造される季節が異なれば、菌叢も変化する。表3では、通気攪拌発酵（深部発酵）で製造されている食酢醪中から分離された混濁性酢酸菌も加え、公知菌株と性質を比較した。中酸度発酵菌とし

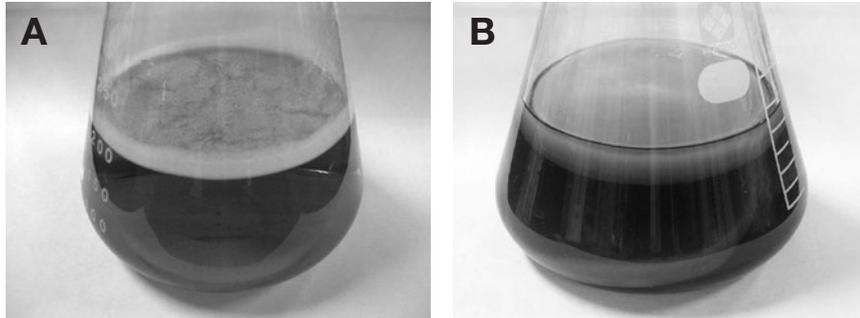


図8 静置培養での菌膜 (A) および厚膜形成菌によるコンニャク様厚膜 (B)

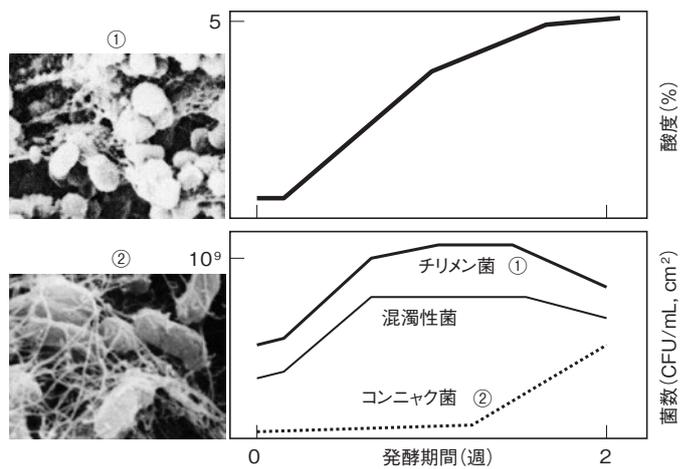


図9 米酢静置発酵中の菌叢の変化

(文献7)より引用、他の文献6)や複数の企業での知見も合わせて作成)

表3 食酢発酵醪から分離された優良酢酸菌の特性^{8,9)}

	1012	712	5119	1002	1028	<i>A.pasterianus</i> IFO3223	<i>A.aceti</i> ATCC15973	<i>A.xylinum</i> IFO3288
カタラーゼ	+	+	+	+	(+)	+	+	+
グリセロールのケト化	-	+	+	-	-	-	+	+
5-KG生成	-	+	+	-	-	-	+	+
2-KG生成	+	+	+	+	-	+	+	+
2,5-DKG生成	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコン酸生成	+	+	+	+	(+)	+	+	+
エタノール下での生育	-	+	-	-	-	-	+	-
セルロース生成	-	-	+	-	-	-	-	+
γ-ピロニン生成	-	-	-	-	-	-	-	-
褐色色素生成	-	-	-	-	-	-	-	-
ユビキノタイプ	Q9	Q9	Q10	Q10	Q10	Q9	Q9	Q10
GC含量(mol %)				57	58			63
DNA相同性(%)				48	(100)			39

5-KG; 5-ケトグルコン酸、2-KG; 2-ケトグルコン酸、2,5-DKG; 2,5-ジケトグルコン酸、1012; チリメン菌、712; 混濁性菌、5119; コンニャク菌、1002; 中酸度発酵菌、1028; 高酸度発酵菌

て分離された有用酢酸菌は、酢酸濃度が5～10%での深部発酵に適しており、菌の同定結果が目目されたが、予想を覆し、*A. xylinum* (= *Ga. xylinus*) の膜結合型脱水素酵素活性やセルロース生成能の欠失株とされた。酢酸菌においては表現形質を欠失する現象が古くから知られており、本菌においても酢酸濃度の高い環境で長年に亘って馴化されることで、生存に必須でない代謝系を失ったことは、ATPの浪費を抑えることに繋がるため、環境適応の結果と考えられる。

深部発酵によって製造され、酢酸濃度が10%を超える食酢の中で、無色透明に近い原料加工用・業務用食酢は、ホワイトビネガーと呼ばれ、一般の小売店では見つけることが難しい。しかし、家庭用食酢で原材料に「アルコール」の表示がある場合には、種酢としてホワイトビネガーを使用することが可能となっており、手頃な価格で、癖のある香りがなく、アルコールが原材料名欄に記載されている「穀物酢・米酢」には、これが使用されていることが多い。穀物酢・米酢は、寿司にも広く使用されているため、高酸度のホワイトビネガーは、意外にも結果的に和食に入り込んだ醸造酢となっている。この高酸度発酵中の醪から見出された酢酸菌は、当初、寒天平板培地上でコロニーを形成せず、分離が困難であったが、培地組成や培養条件を工夫することにより可能となった。高酸度発酵菌は、*Acetobacter polyoxogenes*¹⁰⁾あるいは*Acetobacter europaeus*¹¹⁾と命名されたように、*Acetobacter*属に含まれるとされたが、現在では、*Gluconacetobacter*属に組み込まれている。以下では、各有用酢酸菌の特性や製造現場で要求されている条件について記述する。

2) チリメン菌

静置発酵の主要菌としてのチリメン菌が具備すべき性質としては、(1) 酢酸生成能が高く、(2) 酢酸耐性が高いため初発酢酸濃度が高くても速やかに菌膜を張ることができ、(3) 菌膜は壊れにくく、(4) 菌膜の疎水性が高く、相互に接着しにくく、菌膜の伸びがよく、(5) 発酵後の食酢の香味に問題がなく、(6) 酢酸濃度が高くなる発酵後期においてもエタノールを酸化でき、(7) 原料が変更されても増殖が大きく変わらず、(8) 40℃付近の高温に比較的耐性で、(9) 低級アルコール類の酸化速度がエタノールに比べて遅く、(10) 菌株の冷蔵保管中の生存性が高いことが

挙げられる。酢酸菌が菌膜形成能を失う現象も報告されており¹²⁾、製造現場では複数の種類のチリメン菌の共存が必要と考えることもできる。

3) 静置発酵での混濁性菌

静置発酵でチリメン菌を支える混濁性菌が有すべき性質としては、(1) 高温耐性を有する、(2) 発酵後期では必要以上に増殖しないことであろう。実際に静置発酵醪から高温発酵菌が分離されており¹³⁾、増殖の定常期では容易に死滅する現象が報告されている¹⁴⁾。本菌の異常増殖は、静置発酵液の菌体除去にコストがかかるため好ましくない。なお、エタノールを酸化する膜結合型アルコール脱水素酵素 (ADH) の活性が失われた本菌の変異株では、酢酸耐性が低下していたことから、酢酸耐性におけるADHの重要性が示唆された(表4)。

4) 中酸度発酵菌

静置発酵と異なり、混濁性であることが要求される本菌では、酢酸発酵能と酢酸耐性が優れていることに加え、香味の点で特に問題がなければ、中酸度発酵菌として問題ないように思われるかもしれないが、さらに必要とされる性質がある。それは、発酵終了時に菌体凝集剤が添加された際の良好な凝集性である⁸⁾。多糖類が共存すると菌体が凝集し難いことが知られており、菌体外にセルロースなどの多糖類を生成する菌は有用菌ではない。

表4 高温発酵酢酸菌とその変異株の生理学的性質^{14,15)}

	親株	変異株		
		A	B	C
生育	12℃	-	-	-
	20℃	+	+	+
	40℃	+	(+)	(+)
	42℃	+	-	-
	44℃	-	-	-
30℃での				
・酢酸耐性(エタノール無)	5%	2%	1%	1%
・エタノール耐性	10%	10%	8%	8%
・酢酸発酵能	++ (7%)	+	-	-
		(2%)	(0%)	(0%)
プロリン合成能	-	-	-	-
酢酸の酸化能	+	+	+	+
乳酸の酸化能	+	+	+	+
グルコン酸生成能	+	+	+	+
5-ケトグルコン酸生成能	-	-	-	-
ケト化(グリセロール)	-	-	-	-
(ソルビトール)	-	-	-	-
(マンニトール)	-	-	-	-
セルロース生成能	-	-	-	-
カタラーゼ	+	+	+	+
ゼラチンの液化能	-	-	-	-
褐色色素生成能	-	-	-	-
ユビキノントタイプ	Q9	Q9	Q9	Q9

5) 高酸度発酵菌

ドイツのフリングス社は、2種類のアセテーター（通気攪拌発酵装置）を混濁性の高酸度発酵菌と組み合わせて、酢酸濃度が20%のホワイトビネガー製造プラントを世界各国に売り込んでいる。栄養源が非常に乏しい培地で、*A. europaeus* では、620nmの吸光度がわずか0.35（菌数： 2×10^8 /mL）にもかかわらず、20時間で4%ほど酢酸濃度を上昇させており¹¹⁾、*A. polyoxogenes* でも、このレベルの発酵は十分に達成可能である。酢酸の抗菌性を熟知し、日常的に実験用酢酸菌を用いて高栄養源培地で酢酸発酵を研究している研究者から見て、上述の到達酢酸濃度や単位菌体当たりの酢酸生成速度は驚くべき高い値である。後述するように、高酸度発酵菌は、細胞膜結合型脱水素酵素の活性が桁違いに高く、細菌というよりは、むしろ酸化酵素の塊に見える。

高酸度発酵菌としては、(1) 卓越した酢酸耐性を有する、(2) 高い酢酸生成能を持つ、(3) 栄養要求性が高くない、(4) 各種物質への耐性が高い、(5) IS (insertion sequence ; 挿入配列) やファージ感染を乗り越えてきた菌株であることが要求されるであろう。表5に示されるように、実用菌にISが高コピーで存在している¹⁶⁾。また、ホワイトビネガーの品質改良¹⁷⁾のために栄養源を変更した場合、発酵速度の低下が認められることがあるため、上記の(3)および(5)は無視できない。これらの課題解決のためには育種も視野に入れる必要があり、遺伝子の導入が検討された。その結果、酢酸や酸素欠乏による死滅を徹底して抑制し、電気的方法を利用することでDNAの導入が初めて可能となった¹⁸⁾。今後、本菌の育種が注目される。

表5 サザンプロット解析による酢酸菌におけるIS 1380の分布¹⁶⁾

酢酸菌	検出の有無および概数
<i>Acetobacter pasteurianus</i> NCI 1380	+++ (100コピー程度)
<i>A. aceti</i> subsp. <i>aceti</i> No. 1023	+++
<i>A. aceti</i> subsp. <i>aceti</i> IFO 3284	++
<i>A. pasteurianus</i> NCIB 7214	+++
<i>A. xylinum</i> NCIB 11664	+ (10コピー程度)
<i>A. liquefaciens</i> IFO 12388	-
<i>A. hansenii</i> NCIB 8746	-
<i>A. diazotrophicus</i> ATCC 49037	-
<i>A. polyoxogenes</i> NCI 1028*	++
<i>Gluconobacter oxydans</i> ATCC 19357	-
<i>G. cerinus</i> IFO 3267	-
<i>G. asaii</i> IFO 3276	-
<i>Frateuria aurantia</i> IFO 3245	-

* ; ホワイトビネガー製造に使用される実用酢酸菌(高酸度発酵菌)

Ⅲ. 不良菌の有用菌としての利用

1. 不揮発性有機酸を多量生成する酢酸菌

Ga. xylinus は高い酢酸耐性能を保持していることに加え、多くの食酢に含まれるグルコースをグルコン酸に変換(酸化)できる能力が高い。グルコン酸は不揮発性有機酸であり、酢酸特有の刺激臭がないため、酢酸を残しながらもグルコン酸の含量を高めた食酢は、まろやかさが際立つ。ここに着目した研究が行われ、グルコン酸を4%以上も含む独特の米酢を、本菌を用いて連続発酵法で製造できる技術が確立された¹⁹⁾。連続発酵法に拘らなければ、酢酸1.5%、グルコン酸10%を含む酸度4.8%の米酢が試作可能であった²⁾。グルコン酸高含有米酢を使用すれば、減塩寿司酢が開発できる可能性も示唆されており²⁾、本菌の有効活用が期待される。

2. 水溶性酸性多糖類を著量蓄積する酢酸菌

静置発酵の後期に、桶の液表面に出現するコンニャク状の厚膜は、*Ga. xylinus* が形成する純粋なセルロースである。本菌は、発酵中のエタノール濃度が低下しすぎると酢酸の過酸化を行いながら不快臭を発生させるとして、食酢製造者からは不良酢酸菌として扱われてきた。上述した中酸度発酵菌は*Ga. xylinus* と同定されるものの、発酵中のエタノール濃度が一定濃度を下回らないように管理することで食酢の品質を維持している。一方、中酸度発酵においても純粋培養系ではないため、発酵不良が生じることがある。この時の食酢醪から分離された酢酸菌の中に、水溶性酸性多糖類を著量蓄積する株が存在することが初めて見出され、調べてみると食酢工場内には広く分布していることが明らかとなった²⁰⁾。その後、2種類の多糖類は構造決定まで行われた^{21, 22)}。この内の一つは、抗アレルギー²³⁾や抗癌²⁴⁾の効果を期待させる研究成果が提示されており、これの効果を有する粘性の高い寿司酢は、機能性調味料の候補と考えられる。

3. 酢酸耐性乳酸菌およびモニリエラ

一部の食酢工場では、食酢中から酢酸耐性の乳酸菌(*Lactobacillus acetotolerans*)および酵母様糸状菌

のモニリエラ (*Moniliella acetoabutans*) が汚染菌として見出されることがある。しかし見方を変えれば、これらの微生物は、卓越した酸耐性を有していることから、食酢とは無縁の領域で応用が可能である。

IV. 酢酸耐性機構およびそれが強化された有用酢酸菌

殺菌作用を有する酢酸が高濃度含まれる培地・環境において、増殖することさえ可能な酢酸菌が、どのような仕組みで酢酸耐性を獲得したのかは興味のあるところで、いくつかの研究結果がある。それらの知見を集約したのが図 10 である。

前述したように、酢酸菌の ADH と酢酸耐性は密接に関連しているが、研究の当初は、ADH は単に酢酸生成に直接関与する膜結合型酵素としての位置づけであった²⁵⁾。その後の高酸度発酵菌が保有する ADH²⁶⁾ でも、酵素蛋白自体の酸性下の高い安定性が注目された程度であった。しかし、酢酸発酵中の高酸度発酵菌の極めて高い ADH 活性に加えて、アセトアルデヒドを酢酸に酸化する膜結合型アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) も同様に高い活性を有していること²⁷⁾ が、酢酸濃度が 10% を超える環境で増殖するための必要条件として認識されるようになってきた²⁸⁾。一般的な酢酸菌では ADH と ALDH の蛋白総量が全菌体蛋白の 0.7% を占めるのに対し、高酸度発酵菌では 18% を占めることは、高酸度発酵菌は

酢酸を作るためだけに適応を重ねてきたように思われる。

酢酸の排出ポンプ蛋白の存在^{29,30)} や GroESL 蛋白の関与³¹⁾ も強く示唆されている。抗生物質の多剤耐性菌では、メカニズムの一つとして ABC トランスポーターの発現増大による薬剤排出の例が示されており、この蛋白の酢酸排出への転用は、酢酸菌の進化の点でも興味深い。このように、有用な高酸度発酵菌では、これらの酢酸耐性機構が一層強化されていると考えられる。

一方で、栄養源濃度を高めることで酢酸菌の酢酸耐性が向上する現象も認められる。食酢を活性炭処理すると、これに *Ga. xylinus* を接種した際の増殖が遅れる知見が得られていることから³²⁾、活性炭によって除去された低分子物質の具体的な作用点が興味深いところである。

V. 酢酸菌研究の今後

発酵液から生産物を回収・精製して食品添加物や医薬品として用いるアミノ酸発酵工業と異なり、発酵液から菌体のみを除去した液体 (食品) の形で提供する食酢製造は、消費者心理 (安心) の観点から、遺伝子組換え微生物の利用はハードルが高い。従って、数十株の酢酸菌のゲノム解析が終了し、現在は、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析、メタボローム解析が進行中である³⁰⁾ が、これらの成

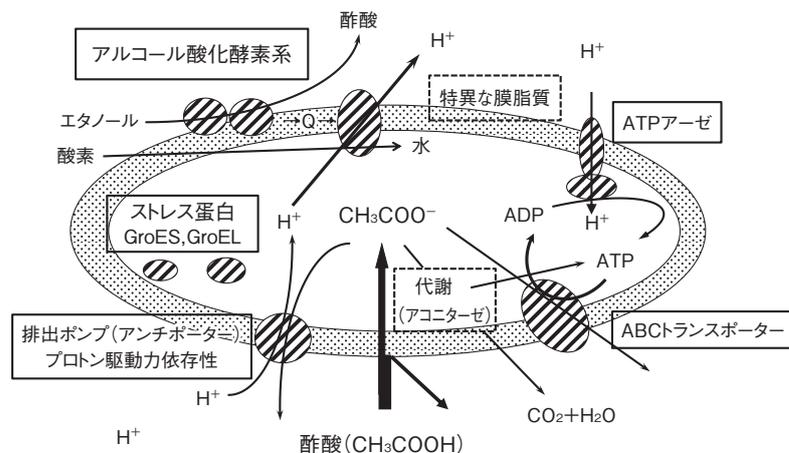


図 10 酢酸菌の酢酸耐性機構

Q; ユビキノン。蛋白を斜線の楕円で表現。エタノールは膜結合型の ADH および ALDH によって酢酸まで酸化。排出ポンプ (アンチポーター) はアルコール酸化酵素系を含む電子伝達系によって形成されるプロトン駆動力によって作動。特異な膜脂質によって、非解離型の酢酸分子の侵入が抑制。ストレス蛋白によって、細胞質蛋白の変性が防止。

果を「食酢の発酵」だけに限れば、工業化できるレベルに持っていくには、純粋培養系に近い高酸度発酵菌に限定し、セルフクローニングや変異処理を駆使した形になると予想される。つまり、複数の種類の酢酸菌が共存する菌膜を用いて開放系で発酵させる昔ながらの製法による「食酢の醸造」は今後100年経っても続けられていくのではなかろうか。それだけに、ローテクノロジーでローコストの「醸造品」にハイテクを導入していくには覚悟と見極めが必要であろう。

おわりに

遺伝子やゲノムの高速解析が可能になり、食品製造で用いられている酢酸菌に病原性因子が存在しないことが確認されたことは³³⁾、約150年前に細菌の一菌種(現在の *A. aceti*) が酢酸発酵することを初めて証明したとされるルイ・パスツールも、当然との表情を見せながらも安堵したに違いない。今回はシリーズの趣旨に沿うため、食酢と直接関係のない酸化発酵(ソルボース発酵(ビタミンCの製造工程)、ジヒドロキシアセトンやケトグルコン酸の発酵)についての記述は除いた。細胞膜に局在する呼吸鎖が短絡的であり、物質輸送を伴う必要がないことも加わって、分子状酸素を用いた強力な酸化反応を細胞膜外表層で行っているのが酢酸菌であり、酢酸存在下であっても行えるのが食酢製造に適した有用酢酸菌である。酸化発酵細菌は酢酸菌だけではないが、これまでの説明で酢酸菌の素晴らしさを理解し、少しでも関心を持っていただけたなら幸いである。

文 献

- 1) 酢酸菌研究会. 酢の機能と科学. 東京: 朝倉書店; 2012. 46-91.
- 2) 多山賢二, 住田初美, 岡本洋子. グルコン酸含有調理品の嗜好性および高濃度グルコン酸発酵液の調製. 日本食生活学会誌. 2011; **22**: 241-249.
- 3) 多山賢二. 生活習慣病に及ぼす食酢の効果. 日本醸造協会雑誌. 2002; **97**: 693-699.
- 4) 円谷悦造. 食中毒菌に対する食酢の抗菌作用. 食品工業. 1998; **41**: 25-34.
- 5) 円谷悦造, 正井博之. 福山米酢の醸造工程中の香味成分および微生物叢の変化. 醱酵工学. 1985; **63**: 211-220.
- 6) 山田巳喜男. 酢酸発酵から生まれる食酢. 日本醸造協会雑誌. 2007; **102**: 115-120.
- 7) 正井博之. 食酢醸造微生物学の進歩(1). 日本醸造協会雑誌. 1984; **79**: 403-408.
- 8) 円谷悦造, 正井博之. 食酢製造における優良酢酸菌の分離と諸性質. 日本醸造協会雑誌. 1984; **79**: 746-750.
- 9) Schuller G, Hertel C and Hammes W P. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; **50**: 2013-2020.
- 10) Entani E, Ohmori S, Masai H, et al. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. J Gene Appl Microbiol. 1985; **31**: 475-490.
- 11) Sievers M and Teuber M. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 1995; **79**: 84S-95S.
- 12) Kanchanarach W, Theeragool G, Inoue T, et al. Acetic Acid Fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: Relationship between Acetic Acid Resistance and Pellicle Polysaccharide Formation. Biosci Biotechnol Biochem. 2010; **74**: 1591-1597.
- 13) Ohmori S, Masai H, Arima K, et al. Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature. Agric Biol Chem. 1980; **44**: 2901-2906.
- 14) Ohmori S, Uozumi T and Beppu T. Loss of Acetic Acid Resistance and Ethanol Oxidizing Ability in an *Acetobacter* Strain. Agric Biol Chem. 1982; **46**: 381-389.
- 15) Okumura H, Uozumi T and Beppu T. Biochemical Characteristics of Spontaneous Mutants of *Acetobacter aceti* Deficient in Ethanol Oxidation. Agric Biol Chem. 1985; **49**: 2485-2487.
- 16) Takemura H, Horinouchi S and Beppu T. Novel insertion sequence IS 1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. J Bacteriol. 1991; **173**: 7070-7076.
- 17) 杉山 聡, 多山賢二, 堀 勉, ほか. マイルドホワイトビネガー. 公開特許公報. 1999; 特開平11-178565
- 18) Tayama K, Fukaya M, Okumura H, et al. Transformation of *Acetobacter polyoxogenes* with Plasmid DNA by Electroporation. Biosci Biotech Biochem. 1994; **58**: 974-975.
- 19) 多山賢二, 杉山 聡, 毛受敬之, ほか. グルコン酸および酢酸含有発酵液の製造方法. 公開特許公報. 1998; 特開平10-286083
- 20) Minakami H, Entani E, Tayama K, et al. Isolation and Characterization of a New Polysaccharide-producing *Acetobacter* sp. Agric Biol Chem. 1984; **48**: 2405-2414.
- 21) Tayama K, Minakami H, Entani E, et al. Structure of an Acidic Polysaccharide from *Acetobacter* sp. NBI 1022. Agric Biol Chem. 1985; **49**: 959-966.
- 22) Tayama K, Minakami H, Fujiyama S, et al. Structure of an Acidic Polysaccharide Elaborated by *Acetobacter* sp. NBI 1005. Agric Biol Chem. 1986; **50**: 1271-1278.
- 23) Saito K, Yajima T, Nishimura H, et al. Soluble Branched β -(1,4)Glucans from *Acetobacter* Species Show Strong

- Activities to Induce Interleukin-12 *in Vitro* and Inhibit T-helper 2 Cellular Response with Immunoglobulin E Production *in Vivo*. J Biol Chem. 2003 ; **278** : 38571-38578.
- 24) Kamiryo Y, Yajima T, Saito K, et al. Soluble branched (1,4)- β -D-glucans from *Acetobacter* species enhance anti-tumor activities against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response. Int J Cancer. 2005 ; **115** : 769-776.
- 25) Adachi O, Tayama K, Shinagawa E, et al. Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. Agric Biol Chem. 1978 ; **42** : 2045-2056.
- 26) Tayama K, Fukaya M, Okumura H, et al. Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov. Appl Microbiol Biotechnol. 1989 ; **32** : 181-185.
- 27) 正井博之. 食酢醸造微生物学の進歩(2). 日本醸造協会雑誌. 1984 ; **79** : 467-474.
- 28) Trcek J, Jernejc K and Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. Extremophiles. 2007 ; **11** : 627-635.
- 29) Matsushita K, Inoue T, Adachi O, et al. *Acetobacter aceti* Possesses a Proton Motive Force-Dependent Efflux System for Acetic Acid. J Bacteriol. 2005 ; **187** : 4346-4352.
- 30) 中野 繁. ポストゲノム時代の酢酸発酵研究. バイオサイエンスとインダストリー . 2007 ; **65** : 287-290.
- 31) Okamoto-Kainuma A, Yan W, Kadono S, et al. Cloning and Characterization of *groESL* Operon in *Acetobacter aceti*. J Biosci Bioeng. 2002 ; **94** : 140-147.
- 32) 多山賢二, 谷本昌太, 岡本洋子. 食酢汚染菌 *Gluconacetobacter xylinus* の増殖に及ぼす食酢成分の影響. 日本食品微生物学会雑誌. 2014 ; **31** : 113-119.
- 33) 酢酸菌研究会. 酢の機能と科学. 東京 : 朝倉書店 ; 2012. 130-157.