

醸造酢製造における微生物汚染制御法に関する研究

松永一彦*, 瀬戸口眞治*, 下野かおり*, 亀澤浩幸*, 西元研了**, 鶴木隆文***

Study on Control and Validation of Microbial Contamination in Production of Vinegar

Kazuhiko MATSUNAGA, Shinji SETOGUCHI, Kaori SHIMONO

Hiroyuki KAMESAWA, Kenryou NISHIMOTO and Takafumi UNOKI

産膜酵母の汚染を防ぐ技術及び汚染を受けたモロミの対処策について検討した。酸度1.5%以上になるように種酢を添加すること,あるいはモロミのエタノールを8.5%以上にする事で産膜酵母の汚染を防ぐことができた。また,わさびやカラシに含まれる揮発成分の一つイソチオシアン酸アリル(AIT)は,酢酸菌よりも産膜酵母に対してより強く殺菌作用を示した。産膜酵母の汚染モロミに対してはAITで殺菌し,酢酸菌膜を移植することで健全な酢酸発酵をすすめることができた。

Keyword : 醸造酢, 産膜酵母, 制御, イソチオシアン酸アリル

1. 緒言

静置発酵法で醸造酢を製造するにあたり,汚染微生物である産膜酵母の増殖によりモロミが腐敗してしまうケースが見られる。産膜酵母は酢酸菌の増殖を抑制し酢酸発酵を阻害してしまうことから,醸造酢を安定的に製造する上で産膜酵母を抑制することが重要な課題となる。現状では,様々な手法で産膜酵母の汚染防止あるいは再発防止に取り組まれているが,完全に抑制することは難しく抜本的な解決に至っていない。

県内の米黒酢メーカーの多くが約50L容の壺を数百本から数千本の単位で露天の壺畑に並べ,静置発酵法により1年以上の発酵・熟成を経て商品化している。また,原料の一部に市販アルコールやビネガー等を使用していないことも特長の一つとして挙げられる。

本研究では,製法の特長を損なうことがないよう原料以外の材料をモロミに直接添加しないこと,また露天に並べられた数百本単位の壺に対応できることを条件に,産膜酵母の汚染を防ぐ技術及び汚染を受けたモロミの対処策について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 産膜酵母の単離及び同定

県内にある醸造酢メーカー等6地点からもろみをサンプリングし,クロラムフェニコール添加YM寒天培地で混釈培養した。釣菌したコロニーを継代培養する作業を繰り返して産膜酵母を単離した¹⁾。単離した産膜酵母については,rDNAの塩基配列を解析し同定を行った。

*食品工業部

**食品工業部(現 化学・環境部)

***大隅地域振興局保健福祉環境部

2.2 産膜酵母の増殖抑制試験

単離同定した産膜酵母(No2: *Issatchenkia orientalis*, No3: *Pichia membranifaciens*, No6: *Pichia anomala*)を試験に使用した。それぞれの試験に際して,3日間振套した前培養液を用いた。

2.2.1 酢酸耐性及びエタノール耐性試験

GYP液体培地(グルコース1g,ポリペプトン0.5g,酵母エキス0.3g,麦芽エキス0.3g,純水100mL)50mLを200mL容三角フラスコに入れ基本培地とした。酢酸耐性試験では基本培地に95%エタノールを2mL添加し,さらに10%ビネガーを目的量加えて培養液とした。また,エタノール耐性試験では,基本培地に95%エタノールを目的量添加して培養液とした。

産膜酵母の前培養液100 μ Lを培養液に植菌し,30 $^{\circ}$ Cに設定したインキュベータ中で14日間培養を行い,外観を観察するとともに定期的に酢酸またはエタノールを定量し,同時に微生物数を計数した。

2.2.2 AITを含有する抗菌シート及びAITによる気相処理

GYP液体培地200mLを300mL容の角形プラスチック容器に入れ,95%エタノールを4mL添加して培養液とした。培養液へ単離同定した産膜酵母(No1: *Pichia membranifaciens*)の前培養液400 μ L及び当センターで保有する酢酸菌(*Acetobacter pasteurianus*)100 μ Lを加えて2週間培養を試みた。なお,容器の蓋には3cm,5cm,7cm,9cm角に切ったAITを含有する抗菌シートを貼付し,また比較用としてその抗菌シートを貼付しないものを用意した。

一方,AITによる気相処理では,以下の方法をとった。すなわち,GYP液体培地1.5Lを3L容セパラブルフラスコ

に入れ、さらに95%エタノール50mLを添加して培養液とした。産膜酵母の前培養液10mLを培養液に植菌し、室温(20~25°C)にて14日間培養を行った。なお培養に際してAIT約20 μ Lを2cm角程度に切った脱脂綿にしみ込ませ、それを容器の蓋に吊り下げることで気相にAITを揮発させた。培養液の観察と微生物数を計数して産膜酵母の増殖抑制について判断した。

2. 3 成分分析

(1) 有機酸

有機酸分析装置(日本分光(株)製)を使用したpH指示薬(BTB)法で分析を行った。なお、カラムにShodex KC811, 移動相に過塩素酸を用いた。

(2) エタノール

RI検出器付き高速液体クロマトグラフ(日本分光(株)製)で分析を行い、カラムはShodex KS801, 移動相は水とした。

(3) 酸度

醸造酢の日本農林規格に従った²⁾。

(4) 微生物数

クロラムフェニコール添加YM寒天培地にサンプル100 μ Lを塗抹し30°Cにて3日間培養を行い、コロニーを計数して微生物数とした。なお、サンプルの希釈液にTween20を添加した0.9%NaCl溶液を使用した。

3. 結果及び考察

3. 1 産膜酵母の単離及び同定

6地点からサンプリングを行い、6株の産膜酵母を単離した。その6株についてrDNAの塩基配列を解析した結果、表1のように同定した。

表1 単離同定した産膜酵母の種名

No	分離源	種名
1	サトウキビ酢もろみ	<i>Pichia membranifaciens</i>
2	サトウキビ酢もろみ	<i>Issatchenkia orientalis</i>
3	米黒酢もろみ	<i>Pichia membranifaciens</i>
4	サトウキビ酢もろみ	<i>Pichia membranifaciens</i>
5	サトウキビ酢もろみ	<i>Pichia membranifaciens</i>
6	紫芋焼酎もろみ	<i>Pichia anomala</i>

3. 2 産膜酵母の増殖抑制試験

3. 2. 1 酢酸耐性

産膜酵母はアルコール発酵から酢酸発酵に移行する時期に増殖するが、酸度1%以上のモロミでは汚染されない傾向が見られたことから、この濃度付近で増殖が抑制されると考えられた。そこで、酢酸を0.6~1.0%の範囲に調整して*Issatchenkia orientalis*(No2), *Pichia membranifaciens*(No3)及び*Pichia anomala*(No6)の培養を行い、酢酸耐性

について検討した(表2)。0, 3, 7, 11日後の微生物数を測定したところ、減少することなく増殖したケース(A), いったんは減少するが11日後には増殖したケース(B), 3日後には30cfu/mL以下に減少したケース(C)に分かれた。ケースAは酢酸濃度が低いとき、ケースCは酢酸濃度が高いとき、ケースBはケースAとケースCの間で観察された。種間でそれらのケースが見られる酢酸の濃度に違いはあるが、酢酸1.0%以上になると全種で増殖が抑制されていた。

表2 産膜酵母の酢酸耐性

	酢酸濃度(%)				
	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
<i>Issatchenkia orientalis</i>	A	A	B	C	C
<i>Pichia membranifaciens</i>		B	B	B	C
<i>Pichia anomala</i>	B	C	C	C	C

A: 増殖した

B: 抑制を受けるが11日後では増殖した

C: 増殖が抑制された

ケースBのように、いったん増殖抑制を受けたにもかかわらず、11日目の微生物数が 1×10^6 cfu/mL以上に増殖した傾向が3種に共通してみられた。その一例として、図1に*Issatchenkia orientalis*の増殖抑制結果を示した。産膜酵母が増殖した培養液では、酢酸が急激に減少しており、またその傾向は3種に共通していた。時間が経過することで酢酸が揮発し、濃度が減少したと考えられたが、コントロールに示したように酢酸は培養期間中ほぼ一定の値であったことから、産膜酵母が酢酸を資化している可能性が考えられた。

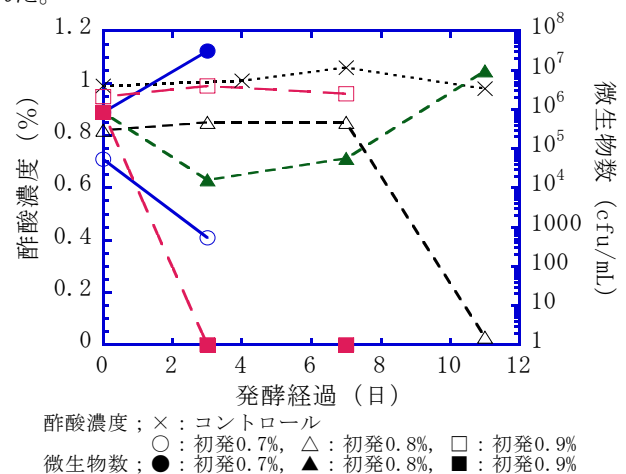


図1 *Issatchenkia orientalis*の酢酸耐性

醸造酢メーカーでは、醸造酢の発酵管理を酢酸ではなく手軽に分析できる酸度で行っている。そこで、酢酸と酸度の関係について図2に示した。酢酸の生成にともない酸度は高くなってくるが、発酵初期には乳酸発酵により乳酸が

生成されるため酸度は酢酸よりも高い値を示す。産膜酵母が増殖抑制を受けた酢酸1%に達するまでに約1ヶ月を要しているが、そのとき酸度は1.5%を示している。このことから、産膜酵母汚染は酸度が1.5%に達する仕込み後約1ヶ月間に注意が必要であった。また、その1ヶ月以内に種酢を添加して酸度1.5%以上に調整することで産膜酵母汚染を未然に防止でき、健全に酢酸発酵をすすめることができることが分かった。

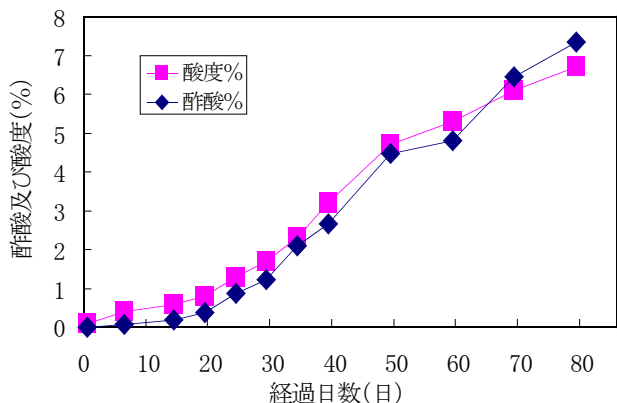
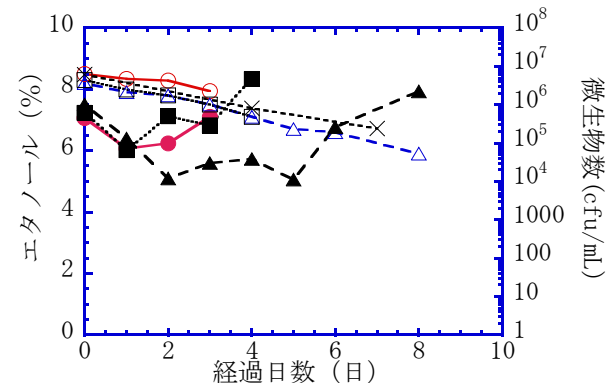


図2 米黒酢醸造における酢酸濃度及び酸度の変化

3. 2. 2 エタノール耐性

複数のモロミについてエタノールを分析したところ、8%以下の濃度で産膜酵母に汚染される傾向が見られた。この濃度付近で増殖が抑制されると考えられたことから、エタノールを約8.4%に調整して *Issatchenkia orientalis* (No2), *Pichia membranifaciens* (No3) 及び *Pichia anomala* (No6) を培養し、エタノール耐性について検討した(図3)。コントロールに示されるように、時間の経過とともにエタノールは減少し、培養期間中一定濃度を維持できないため、各種濃度に設定した培養液をいくつか並べて試験することはできない。

そこで、微生物数が増加に転じた濃度を耐性エタノール濃度として判断した。その濃度は、*Issatchenkia orient-*



エタノール; ×: コントロール,
○: *Issatchenkia orientalis*,
△: *Pichia membranifaciens*, □: *Pichia anomala*
微生物数; ●: *Issatchenkia orientalis*,
▲: *Pichia membranifaciens*, ■: *Pichia anomala*

図3 産膜酵母のエタノール耐性

*alis*で8.0~8.2%, *Pichia membranifaciens*で6.0~6.5%, *Pichia anomala*で7.8~8.0%の範囲であった。以上のことから、産膜酵母汚染はモロミのエタノール濃度を8.5%以上に高めることで防止できることが分かった。

3. 2. 3 AITを含有する抗菌シート及びAITによる気相処理

AITを含有する抗菌シートに対する増殖抑制効果を調べた結果を表3に示した。酢酸菌と産膜酵母の両方を一つの容器に植菌し2週間培養したところ、5cm角より小さい抗菌シートを使用した場合、増殖の速い産膜酵母が優占種となったが、7cm角あるいは9cm角を貼付することで産膜酵母は抑えられ酢酸菌が優占種となった。このことからAITを含有する抗菌シートには産膜酵母の増殖を抑制する効果があり、酢酸菌よりも産膜酵母に対して強く作用することが明らかとなった。産膜酵母は好気性菌で大気の影響を受けやすいことから、抗菌シートから揮発したAITが静菌作用を示したと推測された。

表3 AITを含有した抗菌シートの産膜酵母に対する増殖抑制効果

	AITを含有する抗菌シート				
	無し	3cm角	5cm角	7cm角	9cm角
培養後の優占種	P	P	P	A	A
培養後の酸度(%)	0.1	0.1	0.6	1.5	1.6

P: *Pichia membranifaciens* A: *Acetobacter pasteurianus*

この結果を踏まえて、米黒酢の製造現場で同様の試験を行ったところ、産膜酵母を十分に抑制することは出来なかった。角形プラスチックを用いた基礎試験では、容器の中に抗菌シート全体を挿入することでAITを保持できたのに対し、現場試験ではAITを保持できなかったことが原因であると考えられた。使用した抗菌シートはPETフィルムを基材としており、柔軟性に乏しくやや硬質であったため抗菌シートを壺に挿入した際ヒダ状に折れ曲がり、壺の開口部に隙間が形成され、揮発したAITはその隙間から漏れてしまったと推測された。

そこで、抗菌シートに代えて小さく切った脱脂綿にAITを滲み込ませ、それを壺の内側に貼付する方法を試みた。この方法では、脱脂綿が壺の外にはみ出すことなく全体を挿入できるため気密となり、適用初期の気相におけるAIT濃度を高くすることが可能となった。

本手法を採用しセパラブルフラスコを使って産膜酵母を培養したところ、2週間後の微生物数は3種全てで30cfu/mL以下となった。AITは *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens* 及び *Pichia anomala* に対して殺菌作用を示すことが明らかとなった。一方、同様の試験を酢酸菌に対して行ったところ、酢酸菌に対しても殺菌効果が認めら

れた。

現場で本法を試験したところ、基礎試験の結果と同様に産膜酵母と同時に酢酸菌に対しても増殖を抑制してしまった。しかし、AITが揮発して減少していく過程で、酢酸菌膜を繰り返し移植することで酢酸菌膜が形成された。このことは、産膜酵母よりAITの影響を受けにくい酢酸菌が、産膜酵母に先駆けて増殖したことを示していた。

4. 結 言

産膜酵母の汚染を防ぐ技術及び汚染を受けたモロミの対処策について検討を行ったところ、次のことが明らかとなった。

- (1) 酢酸1%以上、エタノール8.5%以上で産膜酵母の増殖は抑制された。それら濃度以下では産膜酵母に汚染される危険性が高いため、酸度1.5%以上になるように種酢を添加すること、あるいはエタノール8.5%以上になるよう

に仕込むことで汚染を防ぐことができた。

- (2) 産膜酵母の汚染モロミに対しては、AITで殺菌し、酢酸菌膜移植により再発酵させることで健全に酢酸発酵をすすめることができた。

謝 辞

産膜酵母の同定は、鹿児島大学農学部藤田清貴博士に実施していただいた。また、現場試験を行うにあたって、(有)重久盛一酢醸造場の協力を得た。ここに感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 鶴木隆文, 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 下野かおり: 鹿児島県工業技術センター研究報告, 18, 7 (2004)
- 2) 醸造酢の日本農林規格: 平成16年6月23日農林水産省告示第1215号