

# 柿酢の製造と酢酸菌の研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

外谷晃大 松村尚樹 吉川拓杜

## 1. はじめに:

秋10月、果樹園で栽培された柿が校内で販売される(図1)。古くから「柿が赤くなれば医者が青くなる」といわれるほど栄養豊富な柿、発酵材料にしたいと思った。2022年1月から~2022年6月までの半年間に柿酢の製造と柿由来酢酸菌についての研究を行った。研究の過程と結果を報告する。



図1 柿(品種にしむら)

## 2. 柿酢の作成:

### 実験1. 仕込み・培養

材料の柿を洗浄し適当に切断後発酵容器に入れた。容器は2個使用(A, B)。柿約400gと同量の砂糖を加え2L(2%)の水を加えた。容器Bには市販パン酵母(ドライ)を5g添加した。暗黒下、25°Cで培養し定期的に糖度(%)とpHを測定した(図2)。5週間培養した結果(図3)、Aは弱い気泡が持続的に発生し、Bは培養直後から激しく気泡が生じアルコール臭が漂い3週目には沈下した。天然酵母と市販パン酵母の差と思われる。



図2 柿発酵の仕込み (A 自然発酵、B パン酵母発酵)



図3 培養5週間後の観察

5週間培養後の液性変化について糖度(%)とpHの測定値をグラフ化した(図4, 5)。

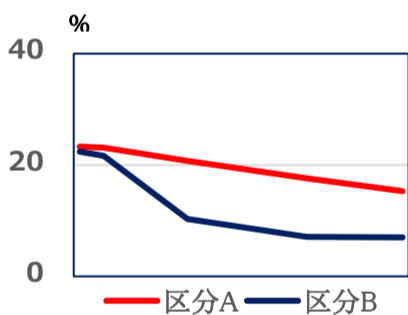


図4 柿培養液の糖度(%)

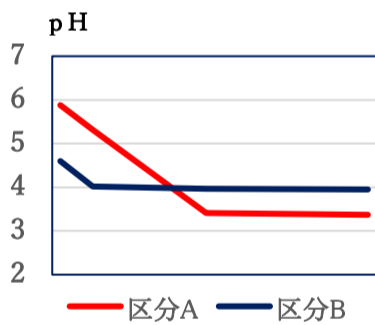


図5 柿培養液のpH

考察:Aの糖度は緩慢に低下し、pHは6から低下し3週目からは3.4を維持した。微生物叢がゆるやかに糖を消費しつつ酸の生成によりpHの低下が窺える。一方Bにおいて、パン酵母の働きで糖量が低下しpH4.0の恒常化が生起したと思われる。

### 実験2. 酢酸発酵

柿培養液(A, B)を搾汁し、布で濾過し沈殿物を取り除いた。液量と糖度を計測し、糖度20%になるまで補糖し25°Cで培養した。柿培養液Aは1週間後には酢酸臭、2週間後には液面に菌膜を確認したが柿培養液Bは特徴的な変化はみられなかった(図6)。培養後1週間毎に酸度を測定した。測定法は中和滴定を試みた。3回の平均値(Vm1)を基に下式から酸度(%)を求めた。



図6 柿培養液(3週間後)

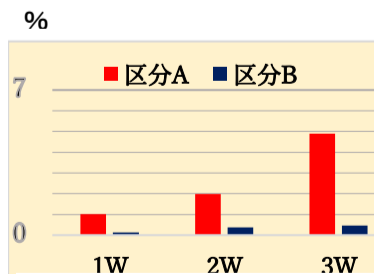


図7 柿培養液の酸度測定

柿培養液(A, B)の酸度(%)を図7に示した。培養液Aは1週間後に酸度1%、2週間後に2%、3週間後は4%まで上昇した。培養液Bは酸度が低く上昇しなかった。

考察:柿培養液Aの酸度の高い理由は酢酸菌の増殖により酢酸を生成したと思われる。培養液Bは市販パン酵母により生産されたアルコール量が多く酢酸が多く生成されると予想したが不調に終わった。酢酸菌が増殖しなかった原因について今後の検討課題としたい。

## 3. 柿酢酸菌の分離、保存:

柿培養液(A, B)をエタノール含有YM培地に塗抹し30°Cで2日間培養した。培養後の結果、区分Aにおいてコロニーの生育がみられた(図8)。形成されたコロニーを7%エタノール含有YM寒天培地(斜面)に接種し30°Cで培養した。培養7日後、コロニーの生成を確認し保存に成功した(図9)。

グルコース	1
ペプトン	0.5
酵母エキス	0.3
麦芽エキス	0.3
寒天	1.7%
pH	5.6

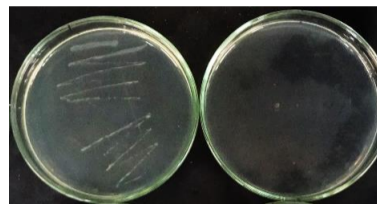


図8 柿酢酸菌の分離(コロニー形成)

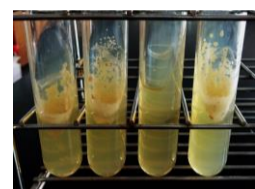


図9 柿由来分離酢酸菌の保存

分離した酢酸菌の細胞像を詳しくしらべるためにSEM(走査電子顕微鏡)により倍率2万倍(×20K)で観察した(図10)。桿菌と判明し細胞の大きさを把握するために長径と短径を計測した。結果と考察:分離した酢酸菌細胞の長径は1.4μm、短径は0.67μm(形状比2.0)で細菌のスケールで短桿菌であった。表面は平滑でなく線毛、莢膜に覆われておりグラム陰性菌の特徴がみられた。

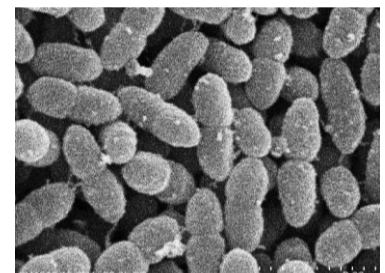


図10 分離酢酸菌細胞(SEM画像) 倍率:20K

## 4. 柿由来酢酸菌の発酵生産能強化に向けて

微生物の有用物質生産能力を高める効果的な育種としてUV、薬剤耐性を指標とする選抜より高生産株を取得する方法の検討があり、分離酢酸菌にUVを照射したあと耐性株を取得し酢酸発酵能を調査する実験を行った。

### 実験: 柿由来分離酢酸菌からUV耐性株の作成

分離酢酸菌培養液100μlをミニシャーレ(3枚)にとりクリーンベンチ内でフタを開けたままでUVを照射した(図11)。試験区は3区分で区分AはUV照射なし、区分BはUV照射90秒、区分CはUV照射120秒と設定した。シャーレ3枚にエタノール0.5mlを入れ60°C以下のYM寒天培地10mlを流し込み混合した。固化後、各区分照射培養液(A, B, C)の希釈液(倍率10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup>)を添加し、コンラージ棒で塗抹、30°Cで3日間培養した。培養後の観察から形成されたコロニーを計測し、UV耐性率を表に示した(図12、表1)。



図11 UV照射

希釈濃度 10<sup>4</sup> 10<sup>5</sup> 10<sup>6</sup>

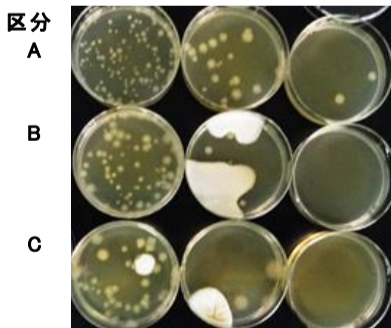


図12 分離酢酸菌のUV耐性試験

表1 分離酢酸菌のUV耐性率(%)

区分	希釈倍率			UV耐性率(%)
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	
A	105	19	2	47.6
B	50	4		
C	35	3	0	

考察と今後:分離酢酸菌はUV60秒、90秒照射下で高い耐性率を示したのでより長時間の照射条件を試みる必要が求められる。今後はUV耐性株の酢酸発酵力を比較するために、酢酸発酵試験を行い発酵能を評価したい。

## 5. 参考文献

農文協書籍 「手づくり酢」 永田十蔵 著