

柿酢の製造と酢酸菌の分離(第2部)

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

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。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10月から~2023年1月まで柿酢の製造を行い、その過程で柿由来酢酸菌を分離した(第1部)。2023年4月~7月に分離酢酸菌のUV耐性株作成、酢酸発酵能比較について実験したので報告する。



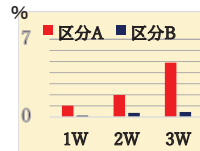
柿(品種にしむら)

1. 先行研究

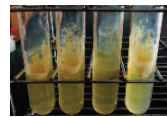
柿酢の作成は、材料の園芸産柿を搾汁し、搾汁液を自然発酵(A)とパン酵母発酵(B)に分けて培養した。培養3週間後、柿培養液の酸度(%)はA 4%、Bは0.5%と差が生じた。柿培養液Aの酸度の高い理由は酢酸菌の増殖により酢酸の生成を促したと考えた。培養液Bは、市販パン酵母の生産したアルコール量が多く、酢酸が多く生成されると予想したが、酢酸菌の生育に困難が生じたと考えた。酢酸菌が増殖しなかった原因については、今後の検討課題とした。



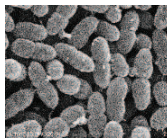
柿培養液(3週間後)
左:A 右:B



柿培養液の酸度変化



柿由来分離酢酸菌保存株



分離酢酸菌細胞(SEM画像)
倍率:20K

2. 柿由来酢酸菌のグラム染色

分離酢酸菌の性質として、グラム陰性の確認実験を行った。グラム染色は、細菌の同定を行ううえで重要な染色法である。グラム陽性とグラム陰性は、細菌の細胞壁の構造や成分により染分けられ判定される。分離した酢酸菌と対照細菌として枯草菌を試料とした。生物顕微鏡で観察した結果、分離酢酸菌は赤色に染色され、グラム陰性を確認した。ちなみに、グラム陽性菌の代表である枯草菌は青色に染色された(図1)。

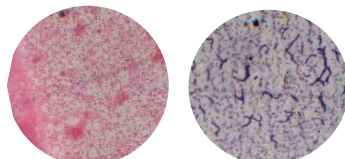


図1 分離酢酸菌のグラム染色結果(×900)
左:柿由来酢酸菌 右:枯草菌

3. 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。分離酢酸菌は、柿酢由来とブドウ酢由来2種類を実験に供した。ブドウ酢由来酢酸菌は2021年分離の研究室保存株である。

3-1 分離酢酸菌 UV 耐性株の作成

柿酢由来酢酸菌とブドウ酢由来酢酸菌の培養液100μlをシャーレ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。試験区は3区分で区分XはUV照射なし、区分YはUV照射240秒、区分ZはUV照射300秒と設定した。



図2 UV照射

シャーレにエタノールを培地の10%分を入れYM寒天培地を流し込み混合した。固化後、各区分照射培養液(X、Y、Z)の希釈液(倍率10⁴~10⁶)を添加し、コンラージ棒で塗抹、30℃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3、表1)。

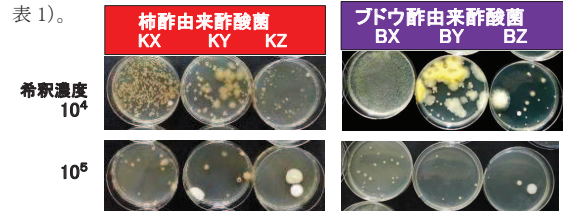


図3 柿酢由来酢酸菌とブドウ酢由来酢酸菌のUV耐性試験

表1 UV照射による分離酢酸菌のコロニー数とUV耐性率(%)

区分	希釈倍率		UV耐性率(%)
	10 ⁴	10 ⁵	
柿 KX	TNTC	20	10.0
	KY	61	
	KZ	22	
ブドウ BX	TNTC	21	9.5
	BY	25	
	BZ	12	

分離酢酸菌のUV照射(240~300秒)による耐性率は5~20%程度であり耐性株を獲得した。但し、一部雑菌に汚染され、コロニー計測に正確さを欠いた。文献から、放線菌の薬剤耐性試験で求められる耐性率は0.1%程度が適当と考えられ、UV照射条件の検討が求められる。

3-2 分離酢酸菌 UV 耐性株の酢酸発酵力調査

柿酢分離酢酸菌株(KX株)、UV240秒耐性株(KY株)、UV300秒耐性株(KZ株)、ブドウ酢分離酢酸菌株(BX株) UV240秒耐性株(BY株)、UV300秒耐性株(BZ株)これら6株を継代培養したコロニーを使用(図4)。培養試験管にアルコール度7.5%に調製した清酒とアルコール度7.5%に調製したYM液体培地を20ml準備した。これら培地に上記6株(KX、KY、KZ、BX、BY、BZ)コロニーの一回金耳接種し、30℃で7日間培養した。培養後の酢酸発酵力を把握するために発酵液1mlを0.1MNaOH(f=1.00)で滴定し中和点の滴定値から酸度を求めた(図5、図6)。尚、酸度は滴定値に0.6を乗じ、酢酸濃度として酸度を計算した。

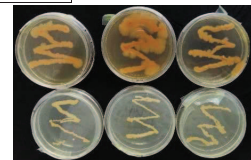


図4 継代培養後の酢酸菌6株
上段:左からKX、KY、KZ 下段:
左からBX、BY、BZの順

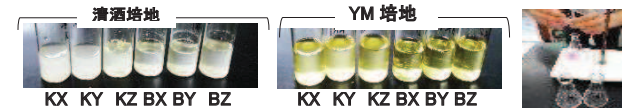


図5 酢酸菌6株の酢酸発酵試験

YM液体培地では分離酢酸菌は未発酵のため、図6から削除した。清酒培地においてブドウ酢由来酢酸菌は高い酢酸発酵力を示し柿由来酢酸菌の発酵力を凌駕した。UV耐性酢酸菌の酢酸発酵力は元株より劣った。UV耐性酢酸菌の酢酸発酵能強化を期待したが不調に終わった。



図6 清酒培地の酢酸菌6株の酢酸発酵試験(酸度測定)

4. 参考文献

紫外線耐性菌の生存メカニズム解析 <https://www.kri.sfc.keio.ac.jp/report>
農文協書籍「手づくり酢」 永田十蔵 著

おわりに:今後の課題として、分離酢酸菌の固体培地(YM寒天)生育に対してYM液体培地で生育しなかった点について検討を深めたい。又、果実酢作成において自然発酵と添加酵母(製パン用)による発酵で差が生じたが解明が待たれる。