

食酢製造に関与する酢酸菌の特性

多山賢二*

(令和5年2月13日受理)

Characteristics of acetic acid bacteria involved in the production of vinegar

Kenji TAYAMA

Summary

Vinegar, considered to be the oldest fermented seasoning in human history, is indispensable not only in Japanese cuisine, but also in Western and Chinese cuisine. The characteristic main component of vinegar is acetic acid, which is made from ethanol by fermentation. Vinegar is produced by acetic acid bacteria that had the ability to oxidize ethanol using molecular oxygen and convert it to acetic acid. Much of the research has been carried out in Japanese research institutes (universities and companies). Entering the 21st century, whole-genome analyses have been carried out on many acetic acid bacteria. Acetic acid bacteria, which forms a pellicle on the surface of the mash and produce acetic acid, is identified as *Acetobacter pasteurianus*. On the other hand, acetic acid bacteria used in the method of high-speed fermentation in submerged culture using a fermenter is identified as *Komagataeibacter xylinus* or *K. europaeus*. Acetic acid makes the medium strongly acidic, which inhibits the growth of many bacteria. In addition, undissociated acetic acid molecules can kill bacteria through lowering the intracellular pH and disrupting the cytoplasmic membrane. Some special acetic acid bacteria capable of high-acidity fermentation used in the production of white vinegar require acetic acid to grow. The acetic acid tolerance of acetic acid bacteria in 16% acetic acid is not simple, and there are many mechanisms.

Key words: acetic acid bacteria, vinegar, acetic acid tolerance

要旨: 食酢の特徴的主成分は酢酸であり、エタノールを含む原材料をもとにして発酵によって作られる。食酢はエタノールを、分子状酸素を用いて酸化し、酢酸に変換できる能力を有する酢酸菌によって製造される。仕込液の表面に菌膜を形成し、酢酸を生成する酢酸菌は *Acetobacter pasteurianus* として、深部発酵の酢酸菌は、*Komagataeibacter xylinus* もしくは *K. europaeus* として同定される。酢酸は生育環境を強い酸性にするため、細菌の多くは増殖が抑制され、濃度を高めれば非解離の酢酸分子による細胞内 pH の低下や細胞質膜の破壊などを通じて細菌を死滅させることもできる。一方で、原料加工用で業務用のホワイトビネガーの製造に用いられる高酸度発酵が可能な特殊な酢酸菌では、生育に高濃度の酢酸を要求するものまで存在する。16%の酢酸を含む培地においても死滅することなく、増殖能さえ維持できている高酸度発酵酢酸菌の酢酸耐性は単純ではなく、多くのメカニズムが存在すると考えられている。

キーワード: 酢酸菌, 食酢, 酢酸耐性

*連絡責任者 (Corresponding author, E-mail: yn5zk2@bma.biglobe.ne.jp)

県立広島大学 地域創生学部 (734-8558 広島市南区宇品東 1-1-71)

Faculty of Regional Development, Prefectural University of Hiroshima, 1-1-71 Ujinahigashi, Minami-ku, Hiroshima 734-8558, Japan

はじめに

紀元前から使用されており、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でも決して欠くことのできないものとなっている。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する。その寿司に欠かせない食酢に関して詳しく論じるのは別の機会としたい。今回は食酢製造に関与する微生物について紹介することとし、特に酢酸菌に関しては詳細に記述したい。酢酸菌や酢酸発酵に直接関与する菌体内酵素に関する詳しい研究、および遺伝学的解析が始まったのが約半世紀前であり、日本国内の研究機関（大学と企業）が主に推進し、様々な知見が蓄積されてきた。ここではその一端を紹介する。

1. 食酢の存在価値

酸味以外の味がほとんどなく、不揮発性ゆえにツンとこない有機酸はいくつか存在する。そのため、揮発性の酢酸が特徴的主成分の食酢に代わる調味料が広がらない状況は不可解であった。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、各種有機酸の精製品を用いて得られた結果は、我々をある程度納得させるものであった¹⁾ (図1)。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が、ハチミツジュースやドリンクヨーグルトでは、酢酸による酸味は最も嫌われた。学生を対象とした官能評価でさえ、このような有意差が出ることから、喉の刺激度合いと食経験の影響が大きいことが明白となった。

2. 食酢の機能

表1にまとめた食酢の機能とは、食酢の原料に由来しないものであって、酢酸の機能・生理機能と判断できるものとして示した。詳細は総説²⁾や成書³⁾に記載されている。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だけの場合には、静菌・殺菌作用が最も注目される。食品衛生学の教科書には、カビは細菌と異なり酸性 (pH5 前後) を好んで生育するとの記載が見受けられるが、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。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であれば、カビの胞子を振りかけて 30℃で 5 日間放置しても増殖が顕著に抑えられることが示されている⁴⁾。また、酢酸が 0.1%存在するだけで、食中毒細菌の増殖が抑制される⁵⁾ (表2)。

食中毒細菌を対象とした殺菌実験では、芽胞を形成する細菌 (セレウス菌など) を除けば、約 2 倍に希釈された食酢 (2.5% 酢酸) によって短時間で 1/1000 にまで生菌を減少させることが可能であり、食塩との併用によって効果が一層高まる⁶⁾ (表3)。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 4~5%であるため³⁾、安価に購入できる食酢を微生物制御に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、それをひたすら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は驚きを隠せないはずである。酢酸耐性機構

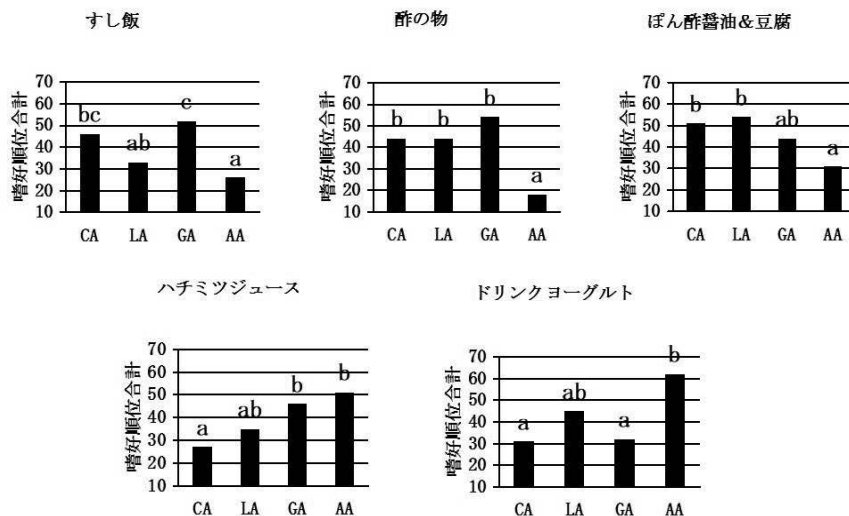


図1. 各種有機酸を用いた調理品における嗜好¹⁾
 CA:クエン酸, LA:乳酸, GA:グルコン酸, AA:酢酸 グラフ上の記号は同一のアルファベットを持たない場合に相互に有意差 (p<0.05) が存在。嗜好順位は評点法により検定した。よって嗜好順位合計は数値が低いほど好まれたことを意味する。

表1. 食酢(酢酸)の機能

作用	期待できる効果
静菌・殺菌作用 食材の酸性化	食中毒予防 食材の軟化促進, 骨との分離促進 Ca・Mgの溶出促進 還元型VitCの保護, 魚臭さ緩和 油の均一化による美味しさ向上 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)
疎水性物質の乳化作用 酸味付与	胃粘膜炎保護, 胃潰瘍予防 消化促進 骨粗しょう症予防 "
胃のPGE ₂ 増大 胃液分泌促進 カルシウム吸収促進 骨形成促進作用 グルコース吸収遅延 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 血管拡張作用 RAA系の抑制 肝臓での脂肪合成抑制・β酸化促進 肝臓でのPPARα活性化	糖尿病予防 "
	" , 肥満予防 肉体疲労時の回復促進 高血圧予防, 冷え性改善 " , 脂質異常症予防 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
 PPARα; 糖質・脂質代謝などに深く関与している転写調節因子

表2. 酢酸の静菌作用⁵⁾

菌株	グルコース 0%		グルコース 10%	
	酢酸0.05%	酢酸0.1%	酢酸0.05%	酢酸0.1%
<i>E.coli</i> O157:H7	++++	-	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	+++	-	+	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++++	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	++++	-	-	-

30°Cで培養. ++++: 1日以内に生育, ++: 2日以内に生育, +: 4日以内に生育
 -: 4日以内には生育せず

表3. 酢酸が主成分の食酢の殺菌作用⁵⁾

菌株	殺菌に要する時間*(分, 30°C)	
	食酢	二杯酢
<i>Escherichia coli</i> O157	150	10
<i>E. coli</i> O26	150	10
<i>E. coli</i> O111	60	1
<i>Citrobacter freundii</i>	10	5
<i>Salmonella enteritidis</i>	10	5
<i>S. typhimurium</i>	10	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<0.25	<0.25
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<0.25	<0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	<0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	360	30
<i>Bacillus cereus</i>	>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

は後述するが、多くの蛋白が関与していることが明らかになっている。

3. 食酢の現代的製法に関わる微生物

古くから用いられている一つの壺のみを用いた米酢の製法では、壺に住み着いている微生物を調べた結果として、酵母は *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces 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* が見出されるとしている⁶⁾。

米のみを原料とした米酢の現代的製法は図2に示しており、3種類の工程が組み合わされている。用いる米麴は、分解酵素として使用する目的であることから、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。

使用する酵母としては、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、*S. 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（エタノール）を原材料として加えた米酢も市販されており（図

2のアルコール発酵工程なし）、価格も抑えられているため人気が高い。

酢酸菌による酢酸発酵を終えた後、数週間から数か月の熟成を経て、製品化（容器詰）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にないという理由もあつてか、品質面での管理を厳密に行わない企業もあると想像される。しかし、製造工程中で不良菌と認定される微生物が生育し、それによって消費者にと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。香りの面で優れた製品を作り出すためには、不快臭を生み出す微生物やそれを運搬する昆虫類は可能な限り排除する必要がある。

壺を用いた伝統的な製法では、個々の壺の菌叢が一定ではないために、製品である黒酢の品質にバラツキが生じる。そのため、食酢の種類に関わらず、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、仕込液や容器・配管を十分に洗浄・殺菌することで、品質の安定化と高い収量を得ているのが現代的製法といえる。しかし、発酵乳のように、特定の菌のみが増殖する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現実である。これは、純粋培養系がもたらすリスクを回避し、長期にわたって安定した酢酸発酵が維持できるようにするための知恵である。例えば、静置発酵の場合、夏場は菌膜表面が40℃に達するが⁷⁾、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と特有のシワ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が存在しており、後述する「混濁性菌」（*A. aceti*）を上げることができる。また、発酵後期の酢酸濃度が高く、チリメン菌にとっては増殖が非常に困難な時期では、酢酸耐性に優れた「コンニャク菌」（*Komagataeibacter xylinus* (= *A. xylinum*)) が酢酸濃度の上昇を補助して

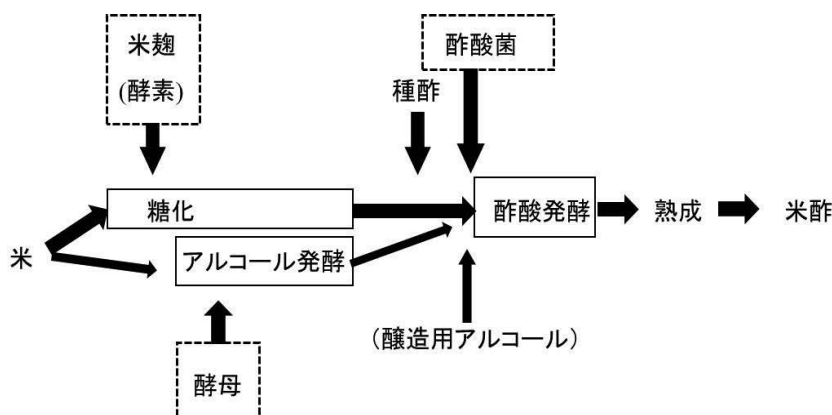


図2. 米酢の製造方法

いる。

表4には、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酢酸菌も含め、公知菌株と性質を比較した結果を示した^{8,9)}。中酸度発酵菌として分離された有用酢酸菌は、酢酸濃度が5~10%での発酵に適しており、*A. xylinum*の一部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同定された。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わた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を示唆している。

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、マヨネーズやケチャップの原材料として用いられている。この高酸度醸造酢の製造に関わる高酸度発酵菌は、当初は*Acetobacter polyoxogenes*あるいは*Acetobacter europaeus*と命名されたように^{9,10)}、*Acetobacter*属の新種として紹介されたが、*Gluconacetobacter*属を経て¹¹⁾、現在では*Komagataeibacter*属に組み込まれている。以下、食酢製造現場に存在する各酢酸菌を中心に、その特性について説明する。

1) チリメン菌

前に紹介した静置発酵の主要菌としてのチリメン菌は以下のような特性を有する。(1)酢酸生成能が高い、(2)酢酸耐性が高い、(3)発酵初期に速やかに菌膜を張ることができる、(4)菌膜が壊れにくい、(5)菌膜の疎水性が高く、相互に接着しにくく、菌膜の伸びがよい、(6)酢酸発酵後の食酢の香味に問題がない、(7)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る、(8)原料が変更されても増殖が大きく変わらない、(9)35~38℃で

死滅しない、(10)低級アルコール類を酸化する速度がエタノールに比べて遅い、(11)菌株の冷蔵保管中の生存性が高い。

酢酸菌が菌膜形成能を失う現象が報告されていることから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。

2) 静置発酵での混濁性菌

静置発酵で主要菌のチリメン菌を支える混濁性菌が有している特性としては、(1)短期間40℃を超えても発酵能を失わない、(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、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¹³⁾。エタノール酸化能は酢酸菌の特徴であるものの、エタノールをアセトアルデヒドに酸化する膜結合型アルコール脱水素酵素(ADH)の活性が失われた株では、酢酸耐性が低下していたことから、ADHの酵素蛋白自体やADH遺伝子の安定性が重要であることが示唆された^{14,15)}(表5)。

3) 中酸度発酵菌

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いことが、中酸度発酵菌が有する特性である。ただし、発酵終了後に菌体の凝集剤が添加された際の良好な凝集性も特性に加えられる。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、そのためにも、菌体外セルロースなどの多糖類を生成する菌は有用菌とは成り得ない。

4) 高酸度発酵菌

高酸度発酵菌は1980年代から性質が調べられた。1990年代に入ると、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）を組み合わせて、酢酸濃度が20%のホワイトビネガーを1バッチ当り20kL以上製造可能な生産プ

表4. 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> ATCC 15973	<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-ピロリン生成	-	-	-	-	-	-	-	-
褐色色素生成	-	-	-	-	-	-	-	-
ユビキノンタイプ	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

ラントを世界各国に売り込むようになった。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; $2 \times 10^8 / \text{mL}$) にも関わらず、20 時間で 4% ほど酢酸濃度を上昇させており¹⁰⁾、*A. polyoxogenes* を用いた場合でも、このレベルの発酵速度は達成できる。酢酸菌を取り扱った経験のない人には理解できないと思われるが、上述の最高到達酢酸濃度や単位菌体当たりの酢酸生成速度は、酢酸の抗菌性を熟知しており、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ると、驚くべき高い値である。後述するように、これら高酸度発酵菌は桁違いに高い細胞膜結合型の酵素活性を有しており、この細菌は酸化酵素の塊と言っても差し支えないくらいのエタノール酸化酵素系蛋白を保有している。

A. polyoxogenes は栄養源を含む培地であっても、塩酸を用いて pH を酸性に調整しただけでは増殖させることができず、酢酸を 4% 以上加えて pH を酸性にすることで初めて増殖が可能となる⁹⁾。酢酸濃度が 7% から 16% の環境下で繰り返し発酵 (半連続バッチ発酵) が、数十年間ほぼ休止することなく行われているため、これに適応した結果、このような奇妙な性質を保持することになったと推測される。

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) 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必要である。表 6 に示されるように、実用酢酸菌に IS が高コピーで存在していることが示されている¹⁶⁾。また、ホワイトビネガーの品質

表5. 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°C	—	—	—	—
	20°C	+	+	+	+
	40°C	+	(+)	(+)	(+)
	42°C	+	—	—	—
	44°C	—	—	—	—
30°Cでの					
	・酢酸耐性(エタノール非存在)	5%	2%	1%	1%
	・エタノール耐性	10%	10%	8%	8%
	・酢酸発酵能	++	+	—	—
	(生成する酢酸)	(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	—	—	—	—
	ユビキノタイプ	Q9	Q9	Q9	Q9

表6. 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. acetisubsp. acetis</i> No. 1023	+++
<i>A. acetisubsp. acetis</i> IFO 3284	++
<i>A. pasteurianus</i> NCIB 7214	+++
<i>A. xylinum</i> NCIB 11664	+
<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)

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ことがあるため、上記の(3)は無視できない。

酢酸濃度の高度化はニーズが高いため、発酵菌の育種も視野に入れる必要があり、高酸度発酵菌への遺伝子の導入が検討された。本菌は酸素欠乏によって非常に死滅しやすいため、DNAの導入は難しいと考えられていたが、高濃度酢酸や酸素欠乏による死滅を、希釈や酸素供給によって徹底して抑制し、電気的に微細な穴を開ける装置を利用することでDNAの導入が初めて可能となった¹⁸⁾。実際に生産に使用されている実用菌のゲノム解析まで行われ¹⁹⁾、3,255,411 bpのゲノムに関して、徐々に特性が明らかになっており(表7)、今後その活用が期待される。

5) 不揮発性有機酸を多量生成する酢酸菌

K. xylinus は高い酢酸耐性能を保持していることに加え、食酢に含まれるグルコースをグルコン酸に変換(酸化)できる能力も高い。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、グルコン酸の含量を高めた食酢は、まるやかさが際立つとされている。ここに着目した研究が行われ、セルロース生成能の低下した本菌を使用し、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²⁰⁾。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ことから²¹⁾、今後の有効活用が期待される。本米酢の応用例として、寿司飯の減塩に役立つ醸造酢としての利用が提案されている²¹⁾。

6) 多糖類を著量生成する酢酸菌

静置発酵の桶の液体表面に、発酵後期になると出現してくる白いコンニャク状の厚膜は、*K. xylinus* が形成する純粋な微小セルロース繊維の塊である。本菌は、食酢中のエタノール濃度が

低下す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嫌われてきた²²⁾(図3)。上述した中酸度発酵菌は*K. 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。

ハエなどの昆虫によっても持ち込まれる本菌の増殖を食酢内で抑制することを目的に、業務用食酢の酸度が比較的低い製品には食塩が添加されている。しかし、減塩が叫ばれている状況でもあることから、食塩に代わる増殖抑制物質が調べられ、その結果、塩化マグネシウム(にがり)が見出された²³⁾。また、食酢に含まれる成分の本菌の増殖への影響も調べられている²⁴⁾。

食酢製造での中酸度発酵は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判明し、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²⁵⁾。その後、2種類の多糖類は構造決定まで行われ、新規であることも示された^{26,27)}。これらに似た構造を示す多糖類では、抗アレルギー²⁸⁾や抗癌²⁹⁾の効果を期待させる研究成果が報告されている。

7) 機能性表示食品などに利用される酢酸菌

食酢製造に使用されているかは明らかにされていないが、アルコール飲料摂取後の呼吸や血中に含まれるアルコール濃度を低減させる目的で、アルコール(エタノール)酸化能を有する酢酸菌を含んだサプリメントが発売されるに至った。また、*Gluconacetobacter hansenii* がホコリやハウスダスト、スギ花粉などに起因する鼻の不快感(アレルギー症状)を緩和する作用^{30,31)}があると論文が発表され、これを含む機能性表示食品が発売されている。

表7.実用高酸度発酵酢酸菌のゲノムの特徴¹⁹⁾

ゲノムサイズ	3,255,411 bp
GC含量	61.9%
遺伝子の占める割合	87%
全遺伝子数	3,184
遺伝子の平均サイズ	943 bp
挿入配列(IS)の数	216
rRNAオペロン数	5
tRNA数	57
内在性プラスミド数	4
上記のサイズ	3.1, 9.4, 19.2, 29.2 kb
ISのゲノム上の分布	ゲノム全域に広く分布
ISの数年以内の転移	内在性プラスミドにも存在 同一菌内で確認

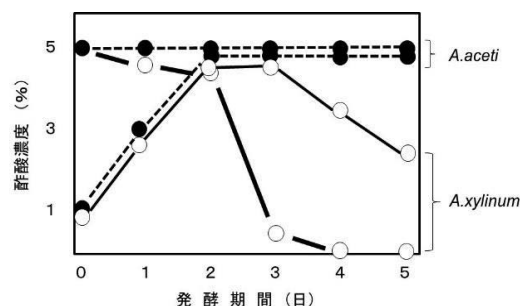


図3. *A. xylinum*の酢酸・エタノール含有培地での特徴²²⁾

5%酢酸を含む培地で培養を開始した場合、*A. xylinum*では酢酸の分解がすぐに始まる。1%酢酸+4%エタノールを含む培地で培養した場合、*A. xylinum*では3日目以降に、蓄積した酢酸の分解が始まる。酢酸の分解過程でプロピオン酸やイソ酪酸の不快臭を発生する。

4. 酢酸耐性機構

酢酸菌は、高濃度の糖やアルコールを様々な糖酸や有機酸にまで酸化的に変換し、培地中に高濃度に蓄積する能力を有している。この反応は、細胞質膜（内膜）の表層で行われる呼吸鎖と直接リンクしている（図4）。有機酸が蓄積した場合には、培地の pH は低下し、共存する他の細菌にとっては増殖が厳しくなる。中途半端な酸化で「酸化発酵」と呼ばれるこの反応には酸素が必要であり、この反応によって ATP の多くを獲得するため、酢酸菌は偏性好気性である。ただし、基質の取込みや産物の排出とリンクしない形で内膜上の酵素群が酸化反応を行うため、非常に高速での酸化生成物蓄積を可能にしている。一方で、ATP の生成効率は低く、酸化発酵を行っている間は、菌体量は多くならないという特徴を有する。

酢酸菌の菌体内では、 NAD(P)^+ 関与の各種脱水素酵素や NAD(P)H 関与の還元酵素が存在しており、図5に示されているように、ペントースリン酸経路、解糖系、TCA サイクルに組み込まれて代謝されていく。グルコースは多くの細菌にとって、良好な炭素源かつエネルギー源であるが、この酸化生成物であるグルコン酸となると、利用可能な細菌は限定される。酢酸菌はグルコン酸を利用可能なため、生存戦略の点では優れているといえるものの、十分に活用できる代謝系ではないため、増殖はかなり悪化する。

微生物に対する殺菌作用を有する酢酸に注目した際、これ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、多くの研究者が探ってきた。メカニ

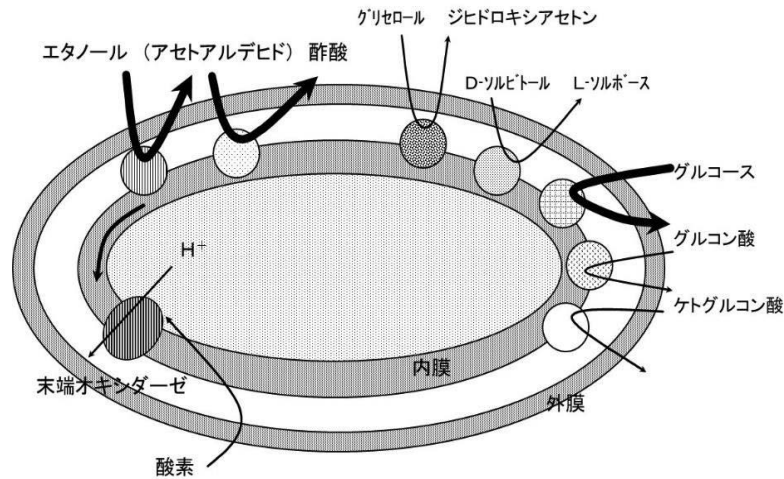


図4. 酢酸菌の細胞質膜(内膜)表層で行われる呼吸鎖とリンクした酸化反応系

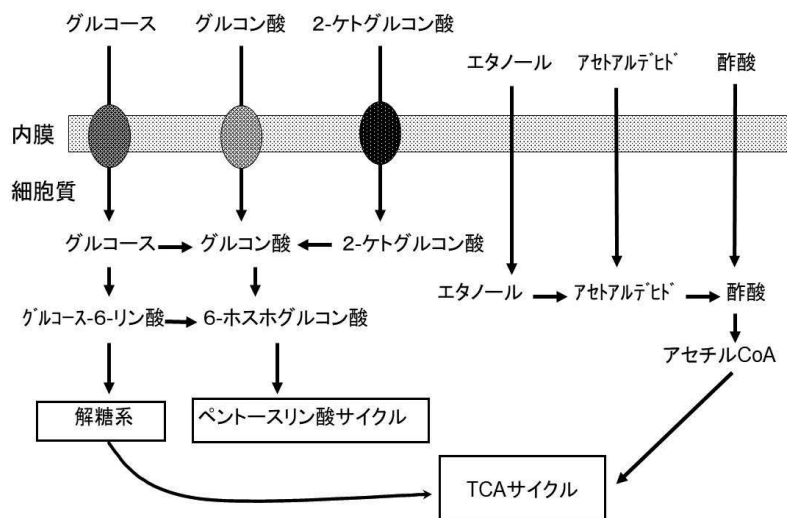


図5. 酢酸菌の菌体内での物質代謝
 NAD(P)^+ 関与の脱水素酵素による酸化および NAD(P)H 関与の還元酵素による還元が進行し、代謝される。

ズムを集約したのが図6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、1978年の研究の当初は、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³²⁾。その後の高酸度発酵菌が保有するADH³³⁾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変換(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³⁴⁾が、酢酸濃度が10%を超える環境で増殖するための必要十分条件として認識されるようになってきた³⁵⁾。高酸度発酵菌(*Ga. entanii*)の性質を表8にまとめた。一般的な酢酸菌ではADHとALDHの合計蛋白量が全菌体蛋白の1%程度を占め、酢酸発酵をさせて

も3%程度であるのに対し、高酸度発酵菌では20%程度を占めることは³⁶⁾、高酸度発酵菌は酢酸を作るためだけに進化を重ねてきたとさえ思えてしまう。

これに加えて、酢酸の排出ポンプ蛋白の存在^{37,38)}やGroESL蛋白の関与³⁹⁾が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、これに似た蛋白が酢酸排出に関与している事実は、酢酸菌の進化の点でも興味深い。特に*A. aceti*で見出されたABCトランスポーター³⁸⁾は、この遺伝子を破壊しても、マクロライド系抗生物質耐性、低pH耐性、乳酸耐性、クエン酸耐性、酢酸資化能に変化が見られない一方で、酢酸耐性とプロピオン酸耐性のみが低下することが明らかとなった。本蛋白

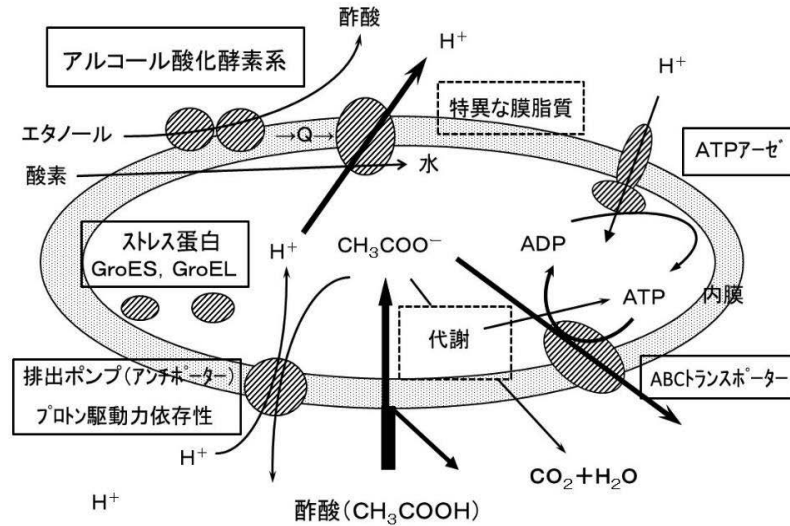


図6. 酢酸菌の酢酸耐性機構
Q;ユビキノン。蛋白を斜線の楕円で表現。

表8. 各種酢酸菌の特徴

	<i>Ga.entanii</i>	<i>K.xylinus</i>	<i>A.aceti</i>	<i>G.suboxydans</i>
pH4~7での生育 (酢酸非含有培地)	-	+	+	+
増殖可能な酢酸域	4~12%	0~9%	0~4%	0~1%
最大の酢酸蓄積濃度	15~21%	8~12%	5%	4%
最大の生育度*	0.4	0.8~2	1~2	1~2
酵素比活性 ADH	29	4.6	3.6	1.8
(U/mg 蛋白)ALDH	35	4.2	3.1	4.0
(測定時の酢酸濃度)	(12%)	(4%)	(4%)	(3%)

*; 2% glucose + 0.2% yeast extract + 0.1% peptone 含有培地での660nmの吸光度

は酢酸によって誘導されることから、酢酸菌の環境適応に強く関わっていることが示唆される。

他方で、単糖・二糖類とは異なる、やや疎水的な低分子物質の濃度を低下させることで、酢酸菌の酢酸含有培地での誘導期が延長する現象も認められている。食酢を活性炭処理し、*K. xylinus* を接種した場合にみられるもので²⁴⁾、活性炭によって除去される低分子物質の具体的な作用点が興味深いところである。

5. 酢酸菌研究の進展

酢酸菌のバクテリオファージに関する報告や特許は、海外あるいは国内で稀にはあるが出されている。酢酸菌が有害微生物であるなら、その制御のための研究・応用は理解できるが、*K. xylinus* はナタデココとして食用にもなっているくらいで、不可解に思われる方もおられるであろう。理由としては、やはりファージ感染問題が、ヨーロッパでも日本国内でも稀に起きていることを示唆している。ファージを単離し、そのゲノム解析結果を基に、食酢発酵液から PCR 法でファージを簡便に検出する方法を提示した特許⁴⁰⁾が出願されている事実は、ファージ汚染対策あるいは予防・予測のための手法が必要であり、これを用いればウイルスとの闘いで優位に立てることを示している。

(1)菌膜形成酢酸菌の遺伝的不安定性⁴¹⁾、(2)高温発酵酢酸菌の耐熱性に関与する遺伝子の特定⁴²⁾、(3)酢酸菌の高温適応進化の仕組み解明⁴³⁾など、興味深い研究も進展してきた。(1)では、*A. pasteurianus* のゲノムにおいてトランスポゾンが全ゲノムの 9%を占めているとの新知見が公表され、(2)では、トランスポゾンによる遺伝子破壊実験から、24 遺伝子の耐熱性への関与を確認し、ゲノム情報を基にした機能予測の結果、ストレス応答、細胞膜(壁)合成、細胞分裂、膜輸送、転写・翻訳に関わる蛋白であったことが明らかになり、(3)では、2500 時間の馴化培養で発酵上限温度を 37°C から 40°C まで向上させた結果、ドラフトゲノム解析により 10 箇所の変異を確認し、呼吸能および酸化ストレス耐性が維持できるように変異したことが示された。

細胞密度に依存して遺伝子発現を調節し、多くのグラム陰性菌で報告されてきた N-アシルホモセリンラクトンを介したクォーラムセンシングが酢酸菌にも存在することが初めて明らかにされた⁴³⁾。*Gluconacetobacter intermedius* のクォーラムセンシングシステムが、上記物質の生合成酵素遺伝子の発現を制御しており、この遺伝子が破壊されることで酢酸やグルコン酸の酸化発

酵が促進される結果が示された。

6. 酢酸菌研究の今後

発酵液から生産物を高度に精製して食品や医薬品として用いるアミノ酸発酵とは異なり、発酵液から菌体のみを除去した液体の形で食酢製品を提供することになる酢酸発酵は、安全面のみならず安心面でも、遺伝子を改変した微生物の利用はハードルが高い。多く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³⁸⁾が、これらをベースにした酢酸菌の育種を工業化できるレベルにまで持っていくことは容易ではない。一方で、昔ながらの表面発酵と呼ばれる製法で、複数の酢酸菌を含む、江戸時代から引き継がれてきたともいわれる菌膜などを使用し、製造規模に関わらず、ほとんどの食酢メーカーにて「醸造品」として製造されている食酢は、その製法への安心感から、今後も消費者に長く受け入れられていくことであろう。

おわりに

酢酸濃度が 20%を超える高酸度醸造酢を製造できる酢酸菌^{9,44)}を実際に研究対象とした時期があったが、非常に過酷な環境での本菌の卓越した発酵能と遭遇し、その不思議さにより酢酸菌に対する著者のイメージは劇的に変わる事となった。酢酸濃度が 15%の半連続発酵系においては、栄養源としての L-システインや L-グルタミン酸の μM レベルでの添加による顕著な増殖および発酵の促進効果が発見されたことで⁴⁵⁾、発酵効率は酢酸菌ではなく機械装置上での酸素供給速度が律速となり、現状の設備レベルでは完成域に到達した。今後は酢酸濃度が 21%の高酸度発酵の発酵効率向上に向けて、高酸度発酵菌の育種しか残されていないと思われる。しかし現時点においてさえ、本菌の 16%酢酸存在下での酢酸耐性メカニズムの鍵は、育種に活かされるほど明らかにはなっていない。今後の研究の進展に期待したい。なお、高酸度発酵については少し説明がなされた解説⁴⁶⁾があり、酢酸耐性に関する詳しい総説⁴⁷⁾も出されている。参考になれば幸いである。

文献

- 1) 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, 22, 241-249 (2011)
- 2) 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, 97, 693-699 (2002)

- 3) 多山賢二, 酢の食品学, 酢酸菌研究会編, 酢の機能と科学, 朝倉書店 (東京) 46-91 (2012)
- 4) 多山賢二, 食酢と微生物, モダンメディア, 63, 83-93 (2016)
- 5) 円谷悦造, 食中毒菌に対する食酢の抗菌作用, 食品工業, 41, 25-34 (1998)
- 6) 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, 醗酵工学, 63, 211-220 (1985)
- 7) 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, 102, 115-120 (2007)
- 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, 79, 746-750 (1984)
- 9) Entani E., Ohmori S., Masai H. and Suzuki K., *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity, *J. Gene. Appl. Microbiol.*, 31, 475-490 (1985)
- 10) Sievers M. and Teuber M., The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production, *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 79: 84S-95S (1995)
- 11) 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.*, 50, 2013-2020 (2000)
- 12) Kanchanarach W., Theeragool G., Inoue T., Yakushi T., Adachi O. and Matsushita K., Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1591-1597 (2010)
- 13) Ohmori S., Masai H., Arima K. and Beppu T., Isolation and identification of acetic acid bacteria for submerged acetic acid fermentation at high temperature, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 2901-2906 (1980)
- 14) Ohmori S., Uozumi T. and Beppu T., Loss of acetic acid resistance and ethanol oxidizing ability in an *Acetobacter* strain, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 381-389 (1982)
- 15) Okumura H., Uozumi T. and Beppu T., Biochemical characteristics of spontaneous mutants of *Acetobacter aceti* deficient in ethanol oxidation, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2485-2487 (1985)
- 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.*, 173, 7070-7076 (1991)
- 17) 杉山 聡, 多山賢二, 堀 勉, 遠山 融, 安達典孝, 船戸二郎, マイルドホワイトビネガー, 公開特許公報, 特開平 11-178565 (1999)
- 18) Tayama K., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y., Horinouchi S. and Beppu T., Transformation of *Acetobacter polyoxogenes* with plasmid DNA by electroporation, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 974-975 (1994)
- 19) 近藤康一, ゲノム配列から見た酢酸菌の特徴, スポットライト NEWS, ミツカングループ本社 (東京), No.3 (2005)
- 20) 多山賢二, 杉山 聡, 毛受敬之, 遠山 融, 安達典孝, 船戸二郎, 川村吉也, 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, 特開平 10-286083 (1998)
- 21) 多山賢二, 岡本洋子, グルコン酸高含有の新醸造米酢の製法および減塩すし飯への応用, 日本醸造協会誌, 114, 511-521 (2019)
- 22) Yamaguchi G. and Masai H., Peroxidized flavor and acidic fraction of rice vinegar, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1907-1911 (1975)
- 23) 多山賢二, 荒木 彩, 鈴木麻希, 岡本洋子, 食酢汚染菌 *Komagataeibacter xylinus* の増殖に及ぼす種々の物質の影響, 日本醸造協会誌, 115, 285-295 (2020)
- 24) 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, 31, 113-119 (2014)
- 25) Minakami H., Entani E., Tayama K., Fujiyama S. and Masai H., Isolation and characterization of a new polysaccharide - producing *Acetobacter* sp., *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2405-2414 (1984)
- 26) Tayama K., Minakami H., Entani E., Fujiyama S. and Masai H., Structure of an acidic polysaccharide from *Acetobacter* sp. NBI 1022, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 959-966 (1985)
- 27) Tayama K., Minakami H., Fujiyama S. and Masai H., Structure of an acidic polysaccharide elaborated by *Acetobacter* sp. NBI 1005, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1271-1278 (1986)

- 28) Saito K., Yajima T., Nishimura H., Aiba K., Ishimitsu R., Matsuguchi T., Fushimi T., Ohshima Y., Tsukamoto Y. and Yoshikai Y., 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.*, **278**, 38571-38578 (2003)
- 29) Kamiryo Y., Yajima T., Saito K., Nishimura H., Fushimi T., Ohshima Y., Tsukamoto Y., Naito S. and Yoshikai Y., Soluble branched (1,4)- β -D-glucans from *Acetobacter* species enhance antitumor activities against MHC class I-negative and -positive malignant melanoma through augmented NK activity and cytotoxic T-cell response, *Int. J. Cancer*, **115**, 769-776 (2005)
- 30) 吉岡智史, 大江真理子, 上條文夏, 島田訓宏, 奥山洋平, 西山 博, 松岡亮輔, 増田泰伸, 金光智行, 榎本雅夫, 酢酸菌 (*Gluconacetobacter hansenii* QP-1) は健常者の鼻の不快感を軽減する, 薬理と治療, **47**, 461-467 (2019)
- 31) 上條文夏, 大江真理子, 吉岡智史, 梶山大地, 島田訓宏, 奥山洋平, 松岡亮輔, 増田泰伸, 金光智行, 榎本雅夫, 酢酸菌 (*Gluconacetobacter hansenii* GK-1) はスギ花粉による鼻の不快感を軽減する, 薬理と治療, **47**, 1993-1999 (2019)
- 32) Adachi O., Tayama K., Shinagawa E., Matsushita K. and Ameyama M., Purification and characterization of particulate alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2045-2056 (1978)
- 33) Tayama K., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y. and Beppu T., Purification and characterization of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 181-185 (1989)
- 34) 正井博之, 食酢醸造微生物学の進歩(2), 日本醸造協会雑誌, **79**, 467-474 (1984)
- 35) 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*, **11**, 627-635 (2007)
- 36) 多山賢二, 塚本義則, 我が国での食酢製造に関する最近の研究, 第5回 国際酒文化学術研究会論文集, 日本醸造学会 (東京), 55-59 (2004)
- 37) Matsushita K., Inoue T., Adachi O. and Toyama H., *Acetobacter aceti* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid, *J. Bacteriol.*, **187**, 4346-4352 (2005)
- 38) 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, **65**, 287-290 (2007)
- 39) Okamoto-Kainuma A., Yan W., Kadono S., Tayama K., Koizumi Y. and Yanagida F., Cloning and characterization of *groESL* operon in *Acetobacter aceti*, *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 140-147 (2002)
- 40) 日比徳浩, 中野 繁, 高本秀司, 酢酸菌ファージ, 公開特許公報, 特開 2016-136850 (2016)
- 41) 松下一信, 松谷峰之介, 薬師寿治, 酢酸菌の適応進化とその適応能を利用した高温酢酸発酵系の開発, 日本醸造協会誌, **105**, 730-737 (2010)
- 42) 山田 守, 赤田倫治, 高坂智之, 東 慶直, 星田尚司, 松下一信, 耐熱性発酵微生物の耐熱性を賦与する分子機構, 化学と生物, **53**, 763-773 (2015)
- 43) Iida A., Ohnishi Y. and Horinouchi S., Control of acetic acid fermentation by quorum sensing via N-acylhomoserine lactones in *Gluconacetobacter intermedius*, *J. Bacteriol.*, **190**, 2546-2555 (2008)
- 44) 東出敏男, 奥村 一, 川村吉也, 久松 眞, 山田哲也, 深部培養改良法による高酸度食酢の製造, 日本食品工業学会誌, **41**, 913-920 (1994)
- 45) 中野 繁, 大野 健, 高酸度食酢およびその製造方法, 再公表特許, 公開番号 WO2014/087464 A1 (2017)
- 46) 多山賢二, 食酢の歴史と製造技術, 発酵と醸造のいろは, エヌ・ティー・エス (東京), 227-236 (2017)
- 47) Xiaoman Qiu, Yao Zhang and Housheng Hong, Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism, *AMB Express*, **11**:29 (2021)