酢酸耐性および酢酸生産速度の高い酢酸菌株の 分離とその性質†

玉井正弘*・丸子 修**・門 隆興*

Isolation and Characterization of Acetic Acid Bacteria with Higher Tolerance and Productivity of Acetic Acid

(Improvement of the Vinegar Brewing Process using Bioreactor, Part VIII)

Masahiro TAMAI*, Osamu MARUKO** and Takaoki KADO*

* Hiroshima Prefectural Food Technology Research Center, 12-70, Hijiymahonmachi,
Minami-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 732

** Mitsubishi Rayon Engineering Co., Ltd., 20-1, Miyuki-cho, Ohtake-shi, Hiroshima 739-06

Screening of acetic acid bacteria that display higher tolerance and productivity of acetic acid was carried out by the continuous culture method from vinegar mash. Twenty strains of acetic acid bacteria were isolated with agar medium from the culture broth that contained 193 g/l of acetic acid. Fed batch fermentation which was maintained at ethanol concentration of 1% (v/v) using an ethanol controller was carried out for isolated acetic acid bacteria, and most of 20 strains were able to produce vinegar containing 16% (w/v) of acetic acid and upward. Strain No. 11 of acetic acid bacteria was selected on the final acetic acid concentration (172 g/l) and productivity. This strain produced vinegar containing 185 g/l of acetic acid at 24°C of cultivation temperature. Strain No. 11 was identified as *Acetobacter aceti* from the physiological and biochemical characteristics.

(Received Jun. 23, 1997 ; Accepted, Sep. 22, 1997)

現在、酢酸発酵は表面発酵と深部発酵の2つの方法で実施されているが、発酵槽からの排出液中の酢酸濃度および酢酸生産速度を高くするために深部発酵法が主流となっている。しかしながら、この深部発酵法でも酢酸生産速度は、酢酸濃度が10% (w/v) で1~2 g-acetic acid/(l·h) 程度と低い。このために、各種の固定化法を用いたバイオリアクターの利用が研究されてきた^{1)~13)}。これらの研究により、酢酸生産速度は飛躍的に向上したが、発酵槽からの排出液中の酢酸濃度はいずれも3~8% (w/v) 程度と低い。生産した食酢の貯蔵・輸送や食品への添加および食酢の味調整等を考慮すると、排出液中の酢酸濃度はより高いことが望まれる。

著者らは既報^{14)~18)}において中空糸膜モジュールを用いて培養槽内から菌体を排出しない完全濃縮培養法および濃縮した菌体の一部を培養槽外に排出する濃縮菌体の一部排出培養法により、酢酸濃度が10および15% (w/v) の食酢を効率的に連続生産できることを報告した。既報のように、より高酸度の食酢を生産できた要因の1つは、高い酢酸濃度においても増殖し、かつ酢酸生産活性を有する酢酸菌を分離し、これを用いたことである。

一般的に、目的とする能力を有する菌株を分離しようとする場合、分離試料から選択培地を用いて直接平板法により分離する方法および集積培養法が実施されてきた。これらの方法で分離した多数の菌株の能力を検定す

† バイオリアクターによる食酢製造工程の改善に関する研究 (第8報) (前報, 文献18))

** 広島県立食品工業技術センター (〒732 広島県広島市南区比治山本町 12-70)

*** 三菱レイヨン・エンジニアリング株式会社 (〒739-06 広島県大竹市御幸町 20-1)

るためには多大の時間と労力を必要とする。ここで、廃水処理に用いられている活性汚泥法を考えると、曝気槽内の環境に適応できない生物は槽外に洗い出され (Wash out)、環境に適応した生物のみが増殖し、槽内に留まることができる。このことより、酢酸菌の連続培養を行いながら発酵槽内の酢酸濃度を次第に増加していくことにより、高い酢酸濃度に耐え、エタノールを基質として増殖可能な菌株のみが発酵槽内に残留すると考えられる。また、高い酢酸濃度においても増殖可能な菌株は、高濃度の酢酸生産が可能であると予想される。よって、このような手法を用いることにより、酢酸耐性と高い酢酸生産能を有する菌株が培地作製程度の少ない労力と高い確率で獲得できると考えられた。

そこで、本報文ではより酢酸濃度の高い食酢の生産を可能とした連続培養法による酢酸菌の分離について報告すると共に分離菌の培養特性および生理学的性質について報告する。

実験方法

1. 酢酸菌の分離

(1) 分離試料

広島県内の食酢醸造場より採取した発酵液を用いた。

(2) 培地組成

i) 連続培養用液体培地

無水グルコース 10 g, 酵母エキス 5 g, ポリペプトン 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.35 g, KH_2PO_4 0.095 g, クエン酸 0.045 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g, エタノール, 酢酸に水道水を加えて 1 l としたものを用いた。

ii) 分離用寒天培地

ポテトデキストロース培地 (日水製薬) 3.9 g, グリセロール 1.5 g, ペプトン 1 g, 酵母エキス 1 g, 肉エキス 1 g を水道水 100 ml に溶解し, 121°C で 10 min 殺菌した。60°C に冷却した後, 所定濃度となるようにエタノールと酢酸を添加したものをを用いた。

(3) 培養方法

i) 前培養

上記組成の液体培地 100 ml を 500 ml 容坂口フラスコに入れて 121°C で 10 min 殺菌した。エタノールと酢酸を 2% (v/v) と 3% (w/v) となるように添加した後, 食酢醸造場から採取した試料を接種し 30°C で振とう培養した。

ii) 連続培養

分離培養は, Fig. 1 に示した装置を用いて行った。30°C に保持した 2 の恒温水槽に入れた 1 の 2 l 容ガラス

Fig. 1 Schematic diagram of experimental set-up

1, fermentor; 2, water bath; 3, magnetic stirrer; 4, medium reservoir; 5, 8, peristaltic pump; 6, DO sensor; 7, DO meter; 9, broth reservoir; 10, air flow meter; 11, air pump.

製発酵槽 (培養実容量: 1.5 l) に 5 の定量ポンプ (東京理化学器械 (株), MP-3) を用いて 4 の新鮮培地を連続的に供給すると共に, 8 の定量ポンプを用いて培養液表面から供給培地に見合う量の培養液を排出することにより, 培養液量を一定に保持した。培養槽内を好気条件に保つために 11 のエアポンプを用いてボールフィルターを通じて空気を通気した。さらに, 3 のマグネットスターラーにより槽内の回転子を回転させて気泡を分散させると共に培養液の混合を行った。この時, 培養液中の溶存酸素濃度 (DO) は, 発酵槽に装着した DO センサーを介して 7 の溶存酸素計で測定し, 2.5 ppm 以上を維持するように通気量と回転数を調整した。

(4) 培養液からの酢酸菌の分離

エタノール濃度を 2% (v/v), 酢酸濃度を 5% (w/v) とした分離用寒天培地を滅菌シャーレに分注して平板を調製した。この平板上に培養槽より採取した培養液を 0.3 ml 塗抹した後, 底面に水を入れたデシケーター内で 1~2 週間, 30°C で培養した。

(5) 分析

酢酸および菌体濃度は, 既報¹⁴⁾と同様に分析した。

2. 酢酸菌の選択

(1) 供試菌株

1~(4) で分離した菌株を用いた。

(2) 培地組成

無水グルコース 30 g, 酵母エキス 1 g, ポリペプトン 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.35 g, KH_2PO_4 0.095 g, クエン酸

0.045 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.006 g に水道水を 0.95 l 加えて 121°C で 20 min 殺菌し、培養開始時にエタノールと酢酸を培地 0.95 l に対して各々 20 と 30 ml 添加した。

(3) 培養方法

i) 前培養

上記組成の培地 100 ml を 500 ml 容坂口フラスコに入れて 121°C で 10 min 殺菌した。エタノールと酢酸を 2% (v/v), 3% (w/v) となるように添加した後、分離菌株を 30°C で 24 時間振とう培養した。

ii) 回分培養

培養は Fig. 2 に示した装置で行った。1 の 5 l 容発酵槽 (KIT 製, 初発培養液量: 2.5 l) に前培養液を 100 ml 接種し、30°C で回分培養を行った。9 のエアポンプを用いて発酵槽に空気を 4 l/min で供給しつつ、攪拌羽根の回転数を調節して溶存酸素濃度を 3 ppm 以上を保持するようにして培養を行った。この時、酢酸発酵に伴って消費されるエタノールは、発酵槽からの排気ガスを冷却管を通して 2 の三角フラスコに導き、4 のエタノールコントローラー (エイブル製, センサー (#3): フィガログラスセンサー No. 384) を用いて培養液中的エタノール濃度を約 1% (v/v) を維持するように 5 のポンプを駆動させて、6 の 99.5% (v/v) のエタノールを発酵槽に供給した。

3. 分離・選択酢酸菌の生理学的性質

(1) 形態

Fig. 2 Schematic diagram of experimental set-up for batch fermentation

1, fermentor; 2, Erlenmeyer flask; 3, gas sensor; 4, ethanol monitor; 5, peristaltic pump; 6, ethanol reservoir; 7, DO sensor; 8, air flow meter; 9, air pump; 10, DO meter; 11, recorder.

YPG 培地 (酵母エキス 1% (w/v), ポリペプトン 1% (w/v), グルコース 1% (w/v)) にエタノールおよび酢酸を 2% (v/v) および 3% (w/v) 添加した培地を用いて 30°C で 2 日間振とう培養後、顕微鏡観察を行った。

(2) 運動性

YPG 培地にエタノールおよび酢酸を 2% (v/v) および 3% (w/v) 添加した培地を用いて 20, 25 と 30°C で 1~2 日間振とう培養した後、懸滴法で観察を行った。

(3) グラム染色

YPG 培地にエタノールおよび酢酸を 2% (v/v) および 3% (w/v) 添加した培地を用いて 30°C で 1~2 日間振とう培養した後、染色操作を行った。

(4) 色素生成

グルコース 3% (w/v), 酵母エキス 0.2% (w/v), ポリペプトン 0.3% (w/v), 炭酸カルシウム 2% (w/v), 寒天 2% (w/v) の組成の斜面培地に接種し、30°C で 10 日間培養した後、色調を観察した。

(5) カタラーゼ試験

スライドグラスに 3% 過酸化水素溶液の一滴を置き、これに斜面培養した菌体を白金耳で付け、気泡の発生を観察した。

(6) 酢酸および乳酸の酸化能

酵母エキス 0.2% (w/v) とポリペプトン 0.3% (w/v) の基本培地に酢酸ナトリウムまたは乳酸ナトリウムを 0.2% 含む培地に、pH 指示薬として 0.002% BTB を加えて、30°C で 7 日間培養した後、培地の色調を観察した。

(7) ケトゲネシス試験

グリセロール 3% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v), ポリペプトン 0.5% (w/v) の培地を用いて、30°C で 2 週間振とう培養後、フェーリング液を添加して色調を観察した。

(8) グルコースおよびフルクトースからの塩化第 2 鉄反応物の生成

グルコースまたはフルクトース 5% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v), 炭酸カルシウム 0.5% (w/v) の培地を用いて、30°C で 2 週間振とう培養後、5% (w/v) 塩化第 2 鉄溶液を滴下して色調を観察した。

(9) グルコン酸の生成

回分培養を行った培養液中のグルコン酸を高速液体クロマトグラフ (日立製作所, 充填剤: HITACHI-GEL 2618, 溶離液: 0.003 M HClO_4 , 溶離液流量: 0.8 ml/min, カラム温度: 55°C) により測定した。

(10) 5-ケトグルコン酸の生成

YPG 培地を用いて 30°C で 2 日間振とう培養した後、

ペーパークロマトグラフ（ブタノール：ピリジン：水＝3：2：15（容量比））により行った。

(11) グルタミン酸寒天培地での増殖

グルタミン酸ナトリウム 0.5% (w/v), グルコース 1% (w/v), KH_2PO_4 0.1% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% (w/v), KCl 0.01% (w/v), 寒天 2% (w/v) の培地を用いて, 30℃ で 10 日間培養した。

(12) マンニトール寒天培地での増殖

マンニトール 2.5% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v), ポリペプトン 0.3% (w/v), 寒天 2% (w/v) の培地を用いて 30℃ で 10 日間培養した。

(13) 増殖への初発 pH の影響

無水グルコース 3% (w/v), エタノール 2% (v/v), 酵母エキス 0.1% (w/v), ポリペプトン 0.02% (w/v), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.035% (w/v), KH_2PO_4 0.0095% (w/v), クエン酸 0.0045% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0006% (w/v) の組成の培地を用いて 1 N HCl で pH を 2～7 に調整し, 30℃ で振とう培養し, 経時的に 650 nm の吸光度を測定した。

(14) 各種炭素源での増殖

各種炭素源 1% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v) の組成の培地を用いて, 30℃ で振とう培養し, 経時的に 650 nm の吸光度を測定した。

(15) 各種炭素源での酸生成

各種炭素源 1% (w/v), 酵母エキス 0.5% (w/v) を含む培地に, pH 指示薬として 0.02% BCP を加えて 30℃ で 7 日間培養した後, 培地の色調を観察した。

実験結果および考察

1. 連続培養法による酢酸耐性菌の分離

高酸度の食酢を生産可能な菌株の分離については, 円谷¹⁹⁾らが自社工場の発酵液から分離できたことを報告している。長年にわたって酢酸発酵を行ってきた食酢醸造場の発酵液中には, 酢酸耐性を有する酢酸菌株が存在している可能性が高いと考えられる。そこで, 広島県内の食酢醸造場より食酢発酵液を採取し, 分離源とした。食酢醸造場から採取した発酵液を坂口フラスコで前培養した後に, Fig. 1 に示した装置の発酵槽に接種し, 2 日間回分培養を行った後に, 酢酸およびエタノール濃度が 2% (w/v) および 5% (v/v) の新鮮培地を 0.03 h⁻¹ の希釈率で供給して連続培養を開始した。連続培養において供給培地中の酢酸濃度を次第に増加させて, 高い酢酸濃度においても増殖が可能な菌株の分離を検討した。培養の経時変化を Fig. 3 に示した。

Fig. 3 Time course of isolation by continuous culture

●, acetic acid in fresh medium; △, ethanol in fresh medium; ▽, dilution rate; ○ acetic acid in broth; □, absorbance at 650 nm.

7 日目に低下していた吸光度が 0.91 に上昇したので, 新鮮培地中の酢酸濃度を 4% (w/v) に増加させた。そして, 酢酸濃度を 11 日目より 6% (w/v) に増加させた。この結果, 培養液中の酢酸濃度は, 6 日目の 52 g-acetic acid/l から 10 日目で 70 g-acetic acid/l, 14 日目で 95 g-acetic acid/l に上昇した。吸光度は, 酢酸濃度を増加させた後はしばらくの間減少したが, 時間の経過と共に次第に上昇してきた。

15 日目より酢酸濃度を 8% (w/v) に増加させると共に, エタノール濃度および希釈率を 4% (v/v) および 0.021 h⁻¹ に低下させて, さらに連続培養を行った。その結果, 培養液中の酢酸濃度は, 23 日目に 117 g-acetic acid/l に上昇した。酢酸濃度および希釈率を 24 日目より 10% (w/v) および 0.012 h⁻¹, 40 日目より 12% (w/v) および 0.01 h⁻¹, 51 日目より 13% (w/v) および 0.01 h⁻¹, 56 日目より 14% (w/v) および 0.007 h⁻¹, 70 日目より 16% (w/v) および 0.006 h⁻¹ に変化させて連続培養を継続した。その結果, 培養液中の酢酸濃度は, 最終的に 193 g-acetic acid/l に達した。この濃度においても酢酸を生産し, 培養液中には顕微鏡観察により菌体の存在が認められた。

23 日目以降, 培養条件を変更する前に培養液を分離用平板上に塗抹して, 酢酸菌の分離を行った。いずれの培養液においても単コロニーが得られ, 酢酸菌を分離でき

たが、85 日目の最も酢酸濃度の高い培養液から得られた単コロニーの内、20 菌株を酢酸耐性菌とした。

2. 分離酢酸菌の選択

酢酸菌を選択するために、分離した 20 菌株について酢酸発酵における回分培養での培養特性を調べた。20 菌株の内、代表的な 6 菌株の回分培養の経時変化を Fig. 4 に示した。

回分培養は、エタノールコントローラーを用いてエタノール濃度が 1% (v/v) となるように 99.5% (v/v) エタノールを流加した。その結果、ほとんどの菌株が 16% (w/v) 以上の酢酸を生産した。このうち、No. 11 の菌株は約 20 h の誘導期の後、60 h で 172 g-acetic acid/l の最も高い酢酸を生産し、高い酢酸濃度においても増殖を継続した。これらのことから、No. 11 の菌株を酢酸耐性および酢酸生産性の高い高濃度酢酸耐性菌とした。

以上のような手法により高濃度酢酸耐性菌を取得できたが、本法以外の取得法として高濃度の酢酸を含む寒天平板上に発酵液を直接塗布してコロニーの形成を図る方法が考えられる。円谷ら¹⁹⁾は高濃度の食酢発酵液から耐

性菌を 6.5% (w/v) の酢酸濃度とした寒天平板により分離していることより、これ以上高い酢酸濃度の寒天平板上では高濃度酢酸耐性菌でも増殖できないと考えられる。一方、著者らが分離試料とした食酢醸造場の発酵液中の酢酸濃度は 10% (w/v) 程度であり、寒天平板中の酢酸濃度が 6.5% (w/v) 程度では酢酸耐性を有していない酢酸菌もコロニーを形成できる可能性がある。また、円谷らが分離した酢酸菌は自社工場において長年にわたって馴養淘汰された結果、酢酸耐性を発現したと考えられるが、著者らが用いた分離試料中の酢酸濃度は 10% (w/v) 程度と低いために、高濃度酢酸に対する耐性を潜在的に有している酢酸菌の耐性が発現していない可能性がある。このため酢酸濃度が 10% (w/v) 程度の発酵液を高い酢酸濃度とした寒天平板上で培養してもコロニーを形成しないことも考えられる。高い酢酸濃度とした寒天平板上でコロニーを形成させるためには、高い酢酸濃度とした培養液を分離試料とすることが必要である。

そこで、高い酢酸濃度とした培養液を得るためには、本法のように連続培養において供給培地中の酢酸濃度を段階的に増加させる以外に、繰り返し回分培養において酢酸濃度を段階的に増加させる方法が考えられる。食酢醸造場の発酵液中には各種の酢酸菌が混在し、この中には 15% (w/v) 以上の高濃度酢酸を生産する能力を有していないが、耐性菌よりも増殖速度および酢酸生産速度の高い菌株が共存していた場合には、この菌株が耐性菌よりも先に増殖して酢酸濃度が上昇することにより、耐性菌の増殖が抑制される可能性がある。繰り返し回分培養を行って、このようなことが繰り返されることにより、培養液中の耐性菌の比率が低下し、寒天平板上での耐性菌のコロニーが形成される可能性が低くなる。本法では、連続培養における希釈率は 0.03 h^{-1} 以下の低い値としているために、耐性菌の増殖速度が低い場合でも増殖が可能である。さらに、供給培地中の酢酸濃度を次第に増加させることにより、酢酸耐性を発現しない菌株は Wash out され、高酢酸濃度環境に適応して酢酸耐性を発現した菌株が培養液中に残留するために、培養液中の耐性菌の比率は増加し、寒天平板上での耐性菌のコロニーが形成される可能性が高くなる。このことにより、分離酢酸菌の能力を検定するための回分培養の回数を減らすことができると考えられ、実際に本法で分離した菌株のほとんどが 16% (w/v) 以上の酢酸を生産した。

また、本法では連続培養の初期において 5% (w/v) の酢酸濃度で培養を開始し、段階的に酢酸濃度を増加させたが、最初から 15% (w/v) 以上の高濃度の酢酸を含む

Fig. 4 Time course of batch fermentation using ethanol controller on isolated acetic acid bacteria

○, acetic acid ; △, ethanol ; ◇, glucose ; □, absorbance at 650 nm.

培地を供給することにより、分離に要する期間を短縮する方法も考えられる。しかしながら、東出ら²⁰⁾が報告しているように回分培養で 17% (w/v) 以上の酢酸を生産できる高濃度酢酸耐性菌でも、初発の酢酸濃度が 11% (w/v) 以上では増殖できないために、連続培養の初期から高い酢酸濃度の培地を供給しても酢酸菌は増殖せず、高い酢酸濃度とした培養液を得ることは困難と考えられる。

3. 分離・選択菌の性質

連続培養および回分培養を行い、最終的に選択した No. 11 の菌株の各種の性質について検討した。

(1) 培養温度の影響

Fig. 2 に示した装置を用いて、培養温度を 24~34℃ の間で変化させて酢酸発酵に与える影響を検討した。培養は 1 回の回分培養の終了後、培養液を 30% 程度発酵槽内に残して、所定量の新鮮培地を流加する繰り返し回分発酵で行い、2 回目の培養の経時変化を Fig. 5 に示した。

34℃ では 1 回目の発酵においても菌体および酢酸濃度が余り増加しなかったために、初発の菌体および酢酸濃度は低くなり、増殖および酢酸生成も低かった。32℃ では増殖速度は最も高く酢酸生産速度も高くなったが、最終酢酸濃度は 10% (w/v) 程度であった。

Fig. 5 Effect of temperature on batch fermentation

●, 24℃; ◇, 26℃; ▽, 28℃; □, 30℃; △, 32℃; ○, 34℃.

30℃ 以下では、いずれも最終酢酸濃度は 16% (w/v) 以上に達した。培養温度の低下により最終酢酸濃度は増加し、24℃ では 185 g-acetic acid/l に達した。しかしながら、培養温度の低下により誘導期が長くなり、酢酸生産速度が低くなる傾向にあり、30℃ では発酵が終了するために要した時間が約 60 h であるのに対して、24℃ では約 105 h を要した。菌体濃度は、いずれも最高濃度に達した後に減少したが、最高濃度は 0.18 から 0.21 g-dry cell/l の間であまり変化しなかった。

(2) 初発酢酸濃度の影響

同様に培養温度を 30℃ として、繰り返し回分発酵における培養液の残存率を 20, 30, 40 および 50% に変化させることにより、初発の酢酸濃度を 40 から 75 g-acetic acid/l に変化させて酢酸発酵に与える影響を検討した。同じ残液率での回分培養を 2 回行い、各 2 回目の培養の経時変化を Fig. 6 に示した。

初発の酢酸濃度が高くなるにつれて、増殖速度および最高菌体濃度が低下した。このために酢酸生産速度も低下し、発酵が終了するために要する時間も長くなり、食酢の生産効率 $((C_{Pr} - C_{Pi})/t) : C_{Pr}$ は最終酢酸濃度、 C_{Pi} は初発酢酸濃度、 t は発酵時間) が低下した。最終酢酸濃度は、40 g-acetic acid/l の場合に少し低い値となったが、50 g-acetic acid/l 以上ではいずれも 16% (w/v) 以

Fig. 6 Effect of initial acetic acid concentration on batch fermentation

Initial acetic acid concentration % (w/v): ○, 4; △, 5; □, 7; ▽, 8.5.

上となった。

東出ら²⁰⁾は、自社工場の高酸度の食酢発酵液(酢酸濃度 150 から 160 g-acetic acid/l) から分離した高酢酸濃度耐性菌の培養特性を検討し、分離菌は培養温度を 30℃ としたエタノール流加回分発酵により約 90 h で 17.6% の酸度の食酢を生産したことを報告している。本研究での分離菌 No. 11 は、ほぼ同様の培養条件において 172 g-acetic acid/l の酢酸を 60 h で生産し、東出らの分離菌と同程度の酢酸濃度の食酢をより短時間で生産できた。また、東出ら²⁰⁾は、回分培養途中で培養温度を段階的に低下させることにより酸度が 20% 以上の食酢を生産できることを報告している。分離菌 No. 11 も培養温度を低下させることにより最終酢酸濃度が上昇しているため、同様の手法を用いることにより、さらの高濃度の酢酸を生産することも可能と考えられる。

(3) 有機酸の生成

培養温度を 30℃、初発酢酸濃度を 50 g-acetic acid/l として回分発酵を行った場合の有機酸生成の経時変化を Table 1 に示した。

生成した有機酸は α -ケトグルタル酸、クエン酸、グルコン酸とこはく酸であった。最も多く生成した有機酸は、グルコン酸であり培養 38 h で 22 g/l であった。 α -ケトグルタル酸は培養の初期に生成し、その後次第に減少した。クエン酸は時間の経過と共に増加したが、グルコン酸と同様に 38 h で最高値となった。こはく酸の生成量は低かった。

(4) 生理学的性質

分離・選択した No. 11 株の諸性質を Table 2 に示した。

形態は、短桿状で運動性は無く、グラム染色は陰性であった。色素生成は観察されず、カタラーゼ反応は陽性であった。酢酸ナトリウムおよび乳酸ナトリウムの酸化能、グリセロールからのケトゲネシス反応、グルコース

およびフルクトースからの塩化第 2 鉄反応は、いずれも陽性であった。グルタミン酸ナトリウムおよびマンニトール寒天培地上で増殖した。グルコン酸と 5-ケトグルコン酸を生成した。増殖可能な pH 範囲は、2.5 以上であった。さらに、安定に増殖可能な酢酸濃度の範囲は、既報¹⁸⁾ のように連続培養において 120 g-acetic acid/l と非常に高い値であった。

各炭素源からの増殖および酸生成能を Table 3 に示した。グルコースをはじめとしてほとんどの糖で増殖したが、エタノール以外のアルコールでは増殖しなかつ

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of acetic acid bacteria No. 11 (I)

Subject	
Shape	short rod
Motility	—
Gram reaction	—
Pigmentation	±
Catalase	+
Production of acetic acid from ethanol	+
Oxidation of acetate	+
Oxidation of lactate	+
Ketogenesis from glycerol	+
FeCl ₃ reaction in ;	
glucose	+
fructose	+
Production of ;	
gluconic acid	+
5-Keto gluconic acid	+
Growth on glutamate agar	+
Growth on mannitol agar	+
pH range for growth	2.5–

Table 1 Production of organic acids on batch culture

Time (h)	α -Ketoglutaric acid (mg/l)	Citric acid (mg/l)	Gluconic acid (mg/l)	Succinic acid (mg/l)	Acetic acid (g/l)
0	49	64	5 270	20	45.7
23	470	170	9 050	30	52.2
27	310	200	14 070	30	73.8
30	290	270	17 210	50	102.6
34	250	340	19 130	40	132.9
38	390	550	22 080	40	159.2
41	280	460	19 530	30	167.1

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of acetic acid bacteria No. 11 (II)

Carbon source	Growth	Acid production
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	—
D-Galactose	+	+
D-Mannose	+	+
D-Ribose	+	—
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
Sucrose	+	—
Maltose	+	—
Lactose	+	—
Rhamnose	+	—
Raffinose	+	—
L-Sorbose	+	—
Starch	—	—
Sorbitol	+	—
Glycerol	+	—
Methanol	—	—
Ethanol	+	+
Propanol	—	—
iso-Propanol	—	—
Butanol	—	—
iso-Butanol	—	—
n-Amyl alcohol	—	—
iso-Amyl alcohol	—	—

た。グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノース、キシロースの糖とエタノールから酸を生成した。

以上の結果から、BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology 9th Ed. より分離・選択菌 No. 11 を *Acetobacter aceti* と同定した。

要 約

酢酸耐性および酢酸生産速度の高い酢酸菌株の取得を目的として、食酢醸造場より採取した発酵液を試料として、連続培養法による分離と培養液中のエタノール濃度の制御による回分培養法による選択を行い、分離・選択した菌株の各種の性質を調べた。

(1) 連続培養において培養液中の酢酸濃度が 193 g-acetic acid/l においても酢酸を生産し、増殖可能な菌株が 20 株得られた。

(2) 得られた 20 株についてエタノール濃度を約 1%

(v/v) に制御した回分培養を行った結果、ほとんどの菌株が 16% (w/v) の酢酸を生産した。この内の No. 11 株は、60 h で 172 g-acetic acid/l の酢酸を生産した。

(3) 選択した No. 11 株は、培養温度を 24℃ とした回分培養において 185 g-acetic acid/l の高濃度の酢酸を生産した。

(4) 分離・選択した菌株 No. 11 は、*Acetobacter aceti* と同定した。

文 献

- OSUGA, J., MORI, A. and KATO, J.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 139 (1984).
- MORI, A., MATUMOTO, N. and IMAI, T.: *Biotechnol. Lett.*, **11**, 183 (1989).
- 松本直巳・菅浦正志：実践バイオリアクター，食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合成果論文集，食品化学新聞社，p. 289 (1990).
- 佐伯明比古：日食工誌，**37**，191 (1990).
- SUN, Y. and FURUSAKI, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 102 (1990).
- GHOMMIDH, C., NAVARRO, J.M. and DURAND, G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 605 (1982).
- 近藤正夫・鈴木康之・加藤 熙：発酵工学，**66**，393 (1988).
- 高田満朗・平光 武：日食工誌，**38**，967 (1991).
- SUEKI, M., KOBAYASHI, N. and SUZUKI, K.: *Biotechnol. Lett.*, **13**, 185 (1991).
- NANBA, A., KIMURA, K. and NAGAI, S.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 175 (1985).
- OKUHARA, A.: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 57 (1985).
- 山下純隆・太田修明・末永 光：日食工誌，**38**，608 (1991).
- PARK, Y.S., OHTAKE, H., TODA, K., FUKAYA, M., OKUMURA, H. and KAWAMURA, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 918 (1989).
- 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，**44**，119 (1997).
- 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，**44**，126 (1997).
- 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，**44**，623 (1997).
- 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，**44**，677 (1997).
- 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，**44**，862 (1997).
- 円谷悦造・正井博之：醸協，**79**，746 (1985).
- 東出敏男・奥村 一・川村吉也・久松 眞・山田 哲也：日食工誌，**41**，913 (1994).

(平成 9 年 6 月 23 日受付，平成 9 年 9 月 22 日受理)