

福岡県農業総合試験場特別報告

第17号

農産物の貯蔵・加工特性とバイオリアクターによる
液状食品製造に関する研究

平成14年3月

福岡県農業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
NO.17

**Studies on the Quality of Agricultural Products in Storage
and Processing and on the Production of Juicy Foods
from Agricultural Products using Bioreactors**

by YAMASHITA Sumitaka

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

March 2002

農産物の貯蔵・加工特性とバイオリアクターによる
液状食品製造に関する研究

山 下 純 隆

2002

序

近年、輸入農産物の増加、個人消費の落ち込みや食生活の多様化などに伴い、農産物の価格が低迷しており、これまで以上の高品質農産物の安定生産や付加価値の高い新たな加工食品の開発が求められている。

本県では、これに対応してポスト・ハーベストの面から研究に着手し、1984年から県単課題「果実の流通技術の確立」で高品質なキウイフルーツを得るための収穫時期、貯蔵・追熟条件と品質の関係を明らかにするとともに、1986年から国庫助成課題「地域特産物の高度加工利用のための微生物等利用技術の開発」、「酵素及び微生物等の利用による機能性を有する食品素材の開発」で微生物や酵素を利用したバイオリアクターによる新しい加工食品の製造開発に取り組んできたところである。

現在、キウイフルーツ全出荷量の50%を越えるまでになった追熟果実「博多^{うれっこ}完熟娘」と「完熟キウイ」の追熟条件や、機能性を有するグルコン酸を含有する液状食品は、これら一連の研究から誕生したものである。

本研究は収穫後の農産物の高付加価値化について、種々検討を行ったものであり、得られた成果は今後の食品流通・加工分野において参考になることが多いと考えられるため、ここに特別報告として公表することとした。皆様に広くご活用いただければ幸いである。

なお、本研究の遂行にあたり、ご指導、ご協力を頂いた関係各位に深く感謝の意を表する。

平成14年 3 月

福岡県農業総合試験場長

大 場 支 征

The first part of the paper discusses the importance of the
second part of the paper discusses the importance of the
third part of the paper discusses the importance of the
fourth part of the paper discusses the importance of the
fifth part of the paper discusses the importance of the
sixth part of the paper discusses the importance of the
seventh part of the paper discusses the importance of the
eighth part of the paper discusses the importance of the
ninth part of the paper discusses the importance of the
tenth part of the paper discusses the importance of the

目 次

第1章 総 論	1
第2章 キウイフルーツの収穫・貯蔵・追熟条件と品質特性.....	4
2.1節 キウイフルーツの収穫時期別成分変化と貯蔵・追熟後の品質変化	4
2.1.1項 序 文	4
2.1.2項 実験方法	4
2.1.3項 結果及び考察	5
2.1.4項 小 括	9
2.2節 キウイフルーツの追熟条件と品質変化	9
2.2.1項 序 文	9
2.2.2項 実験方法	9
2.2.3項 結果及び考察	9
2.2.4項 小 括	12
第3章 酵母を用いたバイオリアクターによる果実酒の連続生産	13
3.1節 有機酸添加によるpH調整が果汁のろ過速度と生成果実酒の品質に 及ぼす影響	13
3.1.1項 序 文	13
3.1.2項 実験方法	13
3.1.3項 結果及び考察	14
3.1.4項 小 括	15
3.2節 固定化酵母を用いたキウイフルーツ果実酒、カキ果実酒の連続生産.....	15
3.2.1項 序 文	15
3.2.2項 実験方法	15
3.2.3項 結果及び考察	16
3.2.4項 小 括	18

第4章 酢酸菌を用いたバイオリアクターによる果実酢の連続生産	19
4.1節 通気攪拌連続発酵における酢酸生成に及ぼす酸素移動度の影響	19
4.1.1項 序 文	19
4.1.2項 実験方法	19
4.1.3項 結果及び考察	20
4.1.4項 小 括	22
4.2節 静置発酵における酢酸生成に及ぼす酸素濃度の影響	22
4.2.1項 序 文	22
4.2.2項 実験方法	22
4.2.3項 結果及び考察	23
4.2.4項 小 括	24
4.3節 木綿織布に固定化した酢酸菌による通気カラム式酢酸発酵	24
4.3.1項 序 文	24
4.3.2項 実験方法	25
4.3.3項 結果及び考察	26
4.3.4項 小 括	28
4.4節 キウイフルーツ酒及びカキ酒を用いた通気カラム式酢酸発酵	28
4.4.1項 序 文	28
4.4.2項 実験方法	29
4.4.3項 実験結果及び考察	29
4.4.4項 小 括	30
4.5節 カキ酒を用いた回転ドラム式酢酸発酵	30
4.5.1項 序 文	30
4.5.2項 実験方法	31
4.5.3項 結果及び考察	32
4.5.4項 小 括	32

第5章 麹菌を用いたバイオリアクターによる酸性調味料素材の生産	33
5.1節 クエン酸生産能力の高い菌株の選定	33
5.1.1項 序 文	33
5.1.2項 実験方法	33
5.1.3項 結果及び考察	33
5.1.4項 小 括	36
5.2節 油脂類の添加によるクエン酸生産性の向上	36
5.2.1項 序 文	36
5.2.2項 実験方法	36
5.2.3項 結果及び考察	37
5.2.4項 小 括	41
5.3節 麹菌 <i>Aspergillus usamii</i> mut. <i>shiro-usamii</i> IFO 6082による クエン酸の連続生産	41
5.3.1項 序 文	41
5.3.2項 実験方法	41
5.3.3項 結果及び考察	43
5.3.4項 小 括	45
第6章 グルコースオキシダーゼを用いた農産物搾汁液からのグルコン酸生産	46
6.1節 農産物搾汁液を原料にした回転振とうによるグルコン酸生成	46
6.1.1項 序 文	46
6.1.2項 実験方法	46
6.1.3項 結果及び考察	47
6.1.4項 小 括	49
6.2節 ジャーファーマンターを用いたグルコン酸生成に及ぼす酵素量と加圧の影響	49
6.2.1項 序 文	49
6.2.2項 実験方法	49
6.2.3項 結果及び考察	50
6.2.4項 小 括	52

6.3節 固定化酵素による反復回分反応と官能評価	52
6.3.1項 序 文	52
6.3.2項 実験方法	53
6.3.3項 結果及び考察	53
6.3.4項 小 括	54
6.4節 グルコン酸を含む酵素反応液を用いた新しい液状食品	54
6.4.1項 序 文	54
6.4.2項 実験方法	54
6.4.3項 結果及び考察	54
6.4.4項 小 括	56
第7章 リアクターによる野菜搾汁液中のシュウ酸除去及びシュウ酸定量	57
7.1節 麦芽根シュウ酸オキシダーゼによるショウガ搾汁液中のシュウ酸分解	57
7.1.1項 序 文	57
7.1.2項 実験方法	57
7.1.3項 結果及び考察	59
7.1.4項 小 括	64
7.2節 麦芽根シュウ酸オキシダーゼを用いたフローインジェクション 分析による野菜搾汁液中のシュウ酸の定量	64
7.2.1項 序 文	64
7.2.2項 実験方法	64
7.2.3項 結果及び考察	66
7.2.4項 小 括	70
第8章 総 括	71
後 記	74
参考文献	75
サマリー	80

第1章 総論

我が国の農林水産業の国内総生産はわずか約10兆円程度にとどまり、食糧自給率もカロリー換算で40%程度に落ち込む中、国内の食品産業の総生産は88兆円にも達している。このような情勢のもと、国内農産物は近年の海外からの輸入増加の影響もあり、価格が低迷し極めて厳しい状況にある。

一方、我が国の園芸農産物の生産の特徴としては、ミカンやキウイフルーツ等、生産過剰傾向に陥っている品目が多いことが挙げられる。これらの農産物では品質の高いものを生産することはもちろんのこと、生食用途以外にこれらを原料にした付加価値の高い加工食品を開発することにより、需要を拡大することが急務となっている。

そこで、本研究ではこれらの農産物の中からキウイフルーツを中心に上げ、これを原料にバイオリアクターを利用した液状食品の製造開発を試みた。

キウイフルーツ (*Actinidia chinensis* PLANCH) はニュージーランド特産の果実であるが、ビタミンCが多く、果肉が緑色で美しいことから若い世代に人気を集め、30年ほど前から日本各地で栽培が始まった。日本のキウイフルーツは、温州ミカンの生産過剰に伴うカンキツ園からの転換等により1985年以降生産量が急増したため、生産過剰が強く危惧され、需要拡大のために有利な加工食品の開発が強く求められてきた。

キウイフルーツを加工食品の原料素材とするためには、原料の品質特性が明らかであるとともに、高品質であることも求められる。キウイフルーツは外観上、果実の成熟到達が判別しにくく、高品質な果実を得るための収穫適期が判断しにくい。また、収穫直後は酸が多く果実が堅いため、食用に供するためには貯蔵と追熟により酸の減少と果実の軟化が必要な果実であるが、貯蔵中や追熟処理中に *Botryosphaeria* 属菌と *Diaporthe* 属菌による軟腐症 (永田ら 1984、梶谷 1994、1996) が発生し、これが果実品質を低下させることから大きな問題となっている。

キウイフルーツは果実の肥大に伴って澱粉や有機酸を蓄積していくが、成熟すると澱粉の減少に伴う糖の増加や有機酸の減少が起こる (OKUSEら 1981、PRATTら 1974、福家ら 1982)。これらの結果から、果実の収穫時期を澱粉含量が増加から減少へ転じる時期で Brix 6.5~7.0 に到達した時点とし、日本では10月下旬から11月中旬が収穫適期とされてきた (真子 1982、久保 1983)。しかし、これらの結果は海外や関東地域で栽培された果実から導かれたものであり、西南暖地の気候で栽培生産される九州産、特に生産量で全国第2位の福岡県産の果実の収穫適期とは異なることも考えられる。さらに、九州では12月一杯までは落葉が完全に終了しないために、澱粉が増加から減少に転じる時期以降も澱粉の生合成は行われるものと推察され、糖度が高い高品質の果実を得るためには極力、収穫時期を遅くする方が良いことも考えられる。

また、生食用及び加工用果実の品質向上を目的とした追熟に関する研究としては、エチレン濃度4~10ppmで12~24時間処理を行い、エチレン除去後に20℃に置くと4日目でも可食状態になり、その後5日間は適熟の状態が保たれる (伊藤ら 1985) との報告があるにすぎない。エチレンを上手に利用すると、低温域、短期間での追熟が可能となることから、結果的に軟腐症の発生を防止できる可能性もある。

一方、バイオリアクターにおける固定化酵素の研究は、1953年に GRUBHOFNER & SCHLEITH がジアゾ化したポリアミノスチレン樹脂にカルボキシペプチダーゼ、ペプシン等を共有結合させた例に端を発する (春見 1993) とされ、60年代に入ると酵素の機能解明や工業的利用の面からの研究が活発化してきた。我が国では、1953年、田辺製薬 (株) にお

いて、*Aspergillus orizae*（糸状菌）の生産するアミノアシラーゼによるDL-アミノ酸の光学分割法が工業化された。この酵素反応は水に溶けた状態の酵素を使う回分法であったが、その後、アミノアシラーゼを陰イオン交換性のDEAE-Sephadexにイオン結合させる方法で固定化したものが、活性や安定性に優れ、再生が可能なため工業的に優れていることがわかり、1969年に固定化酵素の工業的利用が世界で初めて行われた（CHIBATAら 1976）。

70年代になると微生物菌体から酵素を抽出することなく、死滅させた状態の微生物菌体そのものを固定化して利用する固定化微生物の研究が盛んになり、その後、微生物を生かし続けたまま、時には増殖を伴った状態で利用する固定化増殖微生物の技術が考案され、エタノールや有機酸の連続発酵に利用されてきた。その後、様々な物質生産の工業的利用を目指して、酵素や微生物を固定化したバイオリアクターの利用技術が研究されてきた。

しかし、これら研究の多くは、最終的に生産物を分離・精製して利用することを前提にしたものであり、農産物を原料にバイオリアクターを用いて反応させた生成物を含むそのままを食品とするような食品製造のための研究例は少ない。農産物を原料にバイオリアクターを用いて食品製造を行う場合、固定化用担体や固定化用試薬の安全性、農産物原料や固定化酵素・固定化微生物の雑菌による汚染、反応条件が及ぼす食品の品質劣化等、最終的に精製を行う工業的な物質生産とは多くの面で異なることから、独自の研究開発が必要となる。また、バイオリアクターを用いることにより、製造期間の短縮はもちろん、外部から添加することなく農産物の原料素材だけで、新しい成分を含有し、または従来の成分が消失した、その結果、風味や食感が異なり付加価値の高い食品を製造できる可能性もある。

これらの考えに基づき、キウイフルーツの収穫時期や貯蔵・追熟条件と品質の関係を明らかにするとともに、主にキウイフルーツを対象として、微生物や酵素を利用したバイオリアクターによる新しい液状食品を製造開発することを目的に一連の研究を行った。

本論文の構成は以下の通りである。

第2章では、加工原料となるキウイフルーツの収穫時期が異なる果実の収穫直後及び貯蔵・追熟後の内容成分の変化を調査するとともに、長期貯蔵を行うための貯蔵温度と、軟腐症の発生が少なく、さらに高品質な追熟果実を得るためのエチレンを用いた追熟処理条件について検討し、果実の品質特性を明らかにした。第3章では酵母を用いてキウイフルーツやカキ果汁を原料にした果実酒の醸造について検討するとともに、流動床式のバイオリアクターによる果実酒の連続生産についても検討した。第4章では酢酸菌を用いてキウイフルーツ酒やカキ酒を原料にした果実酢の醸造について検討するとともに、通気攪拌式、通気カラム式及び回転ドラム式のバイオリアクターによる果実酢の連続生産について検討した。第5章では麹菌を用いてキウイフルーツ等の果汁を原料にしたクエン酸発酵を行い、酸性調味料素材への利用を検討するとともに、通気攪拌式の2槽式バイオリアクターによるクエン酸の連続発酵生産について検討した。第6章ではグルコースオキシダーゼを用いてキウイフルーツ等の果汁やニンジン等の野菜汁を原料にしたグルコン酸の酸素加圧下における生成について検討するとともに、固定化酵素を組み込んだバイオリアクターによる酸素加圧下でのグルコン酸の連続生産について検討した。第7章では酸素加圧下でシュウ酸オキシダーゼを含む麦芽根を用いて通気攪拌式及び充填式のバイオリアクターによる野菜汁中のシュウ酸の連続分解について検討するとともに、シュウ酸オキシダーゼを含む麦芽根を用いたフローインジェクション分析(FIA)システムによる野菜汁中のシュウ酸の定量を試みた。

本研究は、1984年から1989年にかけて行ったキウイフルーツの収穫時期別や貯蔵中、及び貯蔵・追熟後の品質変化に関する研究、および1987年から2001年にかけて行ったバイオリアクターを利用した一連の液状食品の製造開発に関する研究、これらはいずれも福岡県農業総合試験場生産環境研究所流通加工部（福岡県筑紫野市大字吉木）で行われたものである。

第2章 キウイフルーツの収穫・貯蔵・追熟条件と品質特性

国内産キウイフルーツのほとんどは10月下旬以降収穫された後、ただちに貯蔵庫に搬入され、逐次貯蔵庫から取り出され販売されている。近年、全国的な生産量の高まりとともに生産過剰傾向に陥った結果、消費拡大を図るためには、生食用、加工原料用を問わず、今後は消費者の高糖度志向に合った高品質な果実生産が求められている。

キウイフルーツは果実の肥大に伴って澱粉や有機酸を蓄積していくが、成熟に伴い澱粉の減少と糖の増加及び有機酸の減少が起こる（WRIGHTら 1967、PRATTら 1974、福家ら 1982、1988）ことから、果実の収穫時期を澱粉含量が増加から減少へ転じる時期でBrix 6.5～7.0に到達した時点とし、日本では10月下旬から11月中旬までに収穫が行われてきた（真子 1982）。しかし、九州では12月一杯までは落葉が完全に終了しないために、澱粉が増加から減少に転じる時期以降も澱粉の生合成は行われるものと推察され、糖度が高い高品質の果実を得るためには極力、収穫時期を遅くする方が良いことも考えられる。

さらに、キウイフルーツは貯蔵庫から出荷された後も、追熟が必要であるが、品質の高い果実に熟させるための適切な追熟処理条件が明らかにされていないだけでなく、追熟処理中に微生物による軟腐症が発生し易く問題となっている。

そこで、本章では収穫時期別の果実の内容成分の変化を明らかにし、これら収穫時期の異なる果実を貯蔵し、同一時期に貯蔵庫から出庫してエチレンで追熟を行うことにより、品質の高い果実を得るための収穫適期を明らかにするとともに、長期貯蔵のための貯蔵温度についても検討した。さらに、エチレン濃度やエチレン処理温度等の処理条件が果実の追熟や軟腐症発生に及ぼす影響についても調査し、最適なエチレン追熟処理条件について検討した。

2.1節 キウイフルーツの収穫時期別成分変化と貯蔵・追熟後の品質変化

2.1.1項 序 文

福岡県はキウイフルーツの生産量全国第2位の産地であるが、近年、生産過剰傾向にあり、消費を拡大するためには生食だけでなく加工原料としても、糖度の高い果実の生産が求められている。キウイフルーツは12月下旬には落葉するが、それまでの間、樹上において果実内では澱粉や有機酸の生合成と糖への変換が行われ、熟度の進行とともに果実が軟化する。したがって、収穫時期が品質やその後の貯蔵性に大きく影響を及ぼすと考えられるが、キウイフルーツは収穫適期が外観上判断しにくい果実である。

そこで、収穫時期別に貯蔵を行い、果実の内容成分の変化を明らかにするとともに、貯蔵性と追熟後の果実品質について明らかにすることにより、高品質果実を得るための収穫適期を検討した。さらに、長期に貯蔵するための貯蔵温度の検討を行った。

2.1.2項 実験方法

最適収穫時期を決定するための試験では、10月5日から12月25日にかけて10日毎にキウイフルーツ‘ヘイワード’を収穫し、分析した。果実硬度は富士平製マグネステラー（φ8mmプランジャー）で果皮の上から果実側面を3ヶ所/果を貫入させることにより測定した。全糖は果実表面から5mm程度を環状に剥いた果肉をエタノールで抽出したも

のを一晚塩酸加水分解した後、ハーネス法（福井 1973）により測定した。クエン酸は果汁を0.1N-NaOHを用いた中和滴定により測定し、クエン酸に換算した。澱粉は見かけの含量が算出されるヨウ素呈色反応を利用する方法（JULIANO 1971、山下ら 1993）ではなく、簡易迅速で精度も高い過塩素酸抽出による方法（吉野 1975）を用いて、全糖の分析に使用した果肉部分を供試した。さらに、収穫時期別に厚さ0.02mmのポリエチレンフィルムで折り込み包装し、0℃で貯蔵した。翌年1月9日と3月7日に貯蔵庫から出庫し、エチレン処理を行い、追熟中の食味の官能評価を行った。エチレン処理には60×60×93 cmの密閉アクリルボックスを用いて、10ppm相当量のエチレンガスを注射器により注入し、エアーポンプで10分間アクリルボックス内を攪拌し、20℃で24時間エチレンに暴露した後、果実を取り出し、そのままの温度で追熟を続けた。食味は5名のパネラーにより行い、その評点は優；3、良；2、可；1、不可；0とした。分析供試果実は6果/試験区とした。

また、長期貯蔵のための最適貯蔵温度を決定するための試験では、慣行の収穫時期である11月4日に収穫した果実20kgづつをポリエチレンフィルムで折り込み包装し、それぞれ0、5及び10℃の貯蔵庫に搬入し、経日的に果実硬度の低下をマグネステラーで同様に測定した。

2.1.3項 結果及び考察

10月5日から10日毎に収穫した時期別の果実成分の変化を図2.1-1に示す。澱粉は収穫時期が遅くなるほど減少するが、全糖は逆に急増している。クエン酸は12月になってから、やや減少する傾向がある。また、澱粉を0.9で除した値と全糖の合計値の変化を図2.1-2に示す。この合計値が12月上旬から徐々に増加すること、また、12月25日時点においてもまだすべて落葉していないため、それまで光合成による炭水化物の蓄積が行われてきたと考えられることなどから、高糖度果実を得るためには収穫時期を現行の11月上旬よりも遅くする必要があると推察される。

このことを実証するために、それぞれの収穫日の果実を低温で貯蔵し、1月と3月に出庫してエチレン追熟処理を行い、追熟中のBrix、クエン酸及び食味を調査した。結果を図2.1-3、図2.1-4及び図2.1-5に示す。貯蔵後に追熟を行った結果、Brixとクエン酸は収穫時期が遅い果実ほど高くなっている。Brixは収穫直後の収穫時期別の含量の傾向が貯蔵、追熟後も引き継がれているが、クエン酸は収穫が早いものほど明らかに減少している。これらの結果は、収穫時期にかかわらず12月下旬までには貯蔵果実内の澱粉がほとんど消失していることを考え合わせると、収穫時期が早い果実は貯蔵期間が長くなるために呼吸基質として消費される糖やクエン酸が多くなるためと考えられる。このため、追熟後の食味は、収穫時期が早い果実ほど甘味も酸味も低く、逆に収穫時期が遅い果実では糖度は高く甘味は強いものの、強い酸味が食味評価を下げた。これに対し、12月上旬収穫の果実は1月及び3月まで貯蔵し、出庫後に追熟を行った場合でも、最も高い食味評価であった。

また、長期貯蔵中の貯蔵温度が果実の硬度に及ぼす影響について、図2.1-6に示す。貯蔵温度が低いほど果実硬度は高く保持され、貯蔵中の熟度の進行が抑制されている。このことから、長期貯蔵は凍結しない限り低い温度が望ましいと結論された。

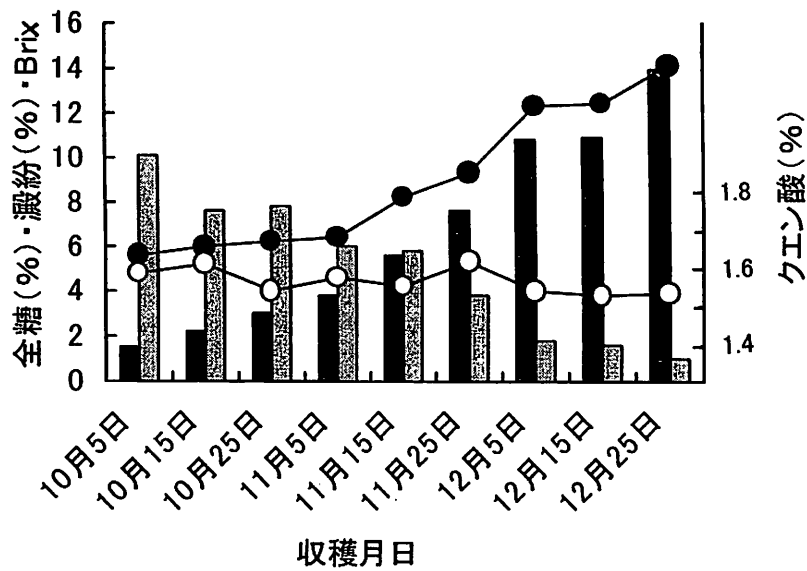


図2.1-1 収穫時期による果実成分の変化

■ 全糖 ▨ 澱粉 ● Brix ○ クエン酸

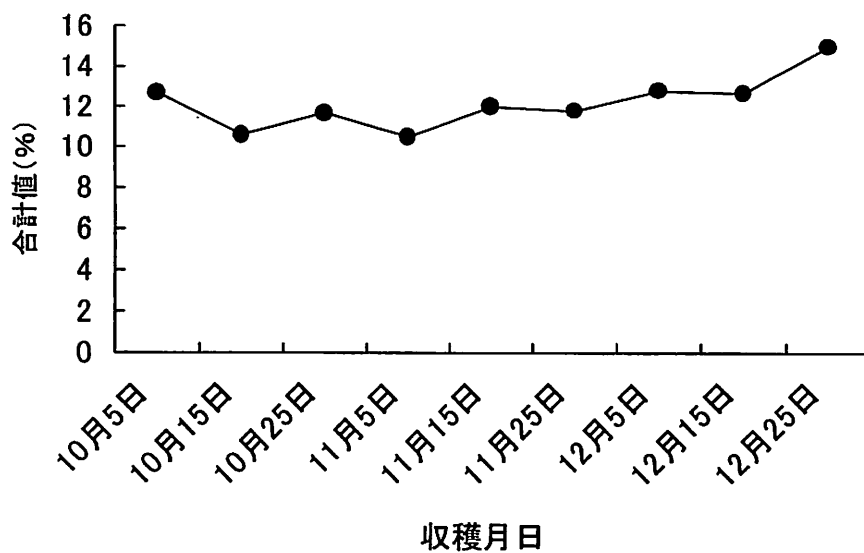


図2.1-2 収穫時期別の全糖と澱粉の合計値の推移

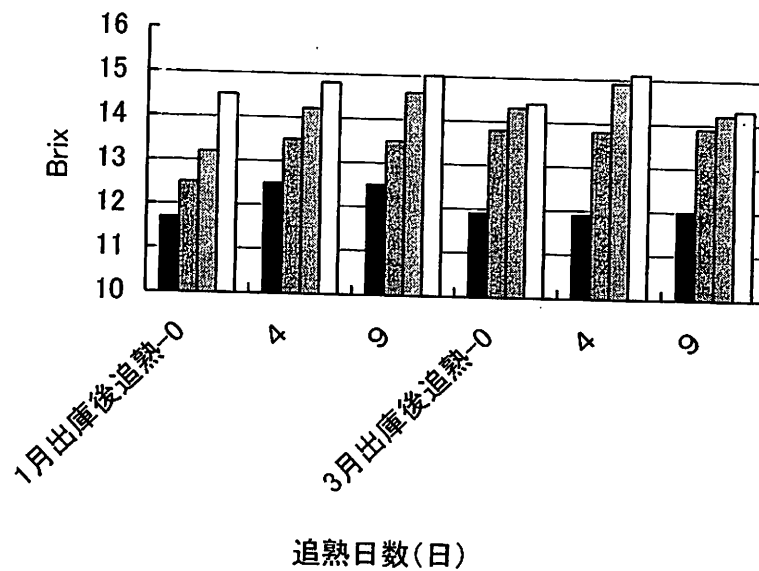


図2.1-3 収穫時期の異なる果実の貯蔵後追熟によるBrixの変化

収穫日: ■ 10月5日 ▨ 11月5日 ▩ 12月5日 □ 12月25日

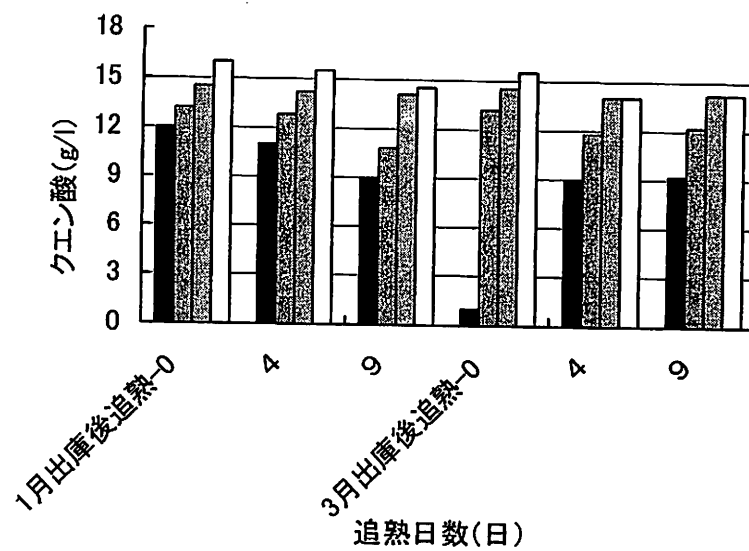


図2.1-4 収穫時期の異なる果実の貯蔵後追熟によるクエン酸の変化

注) 凡例は図 2.1-3 を参照

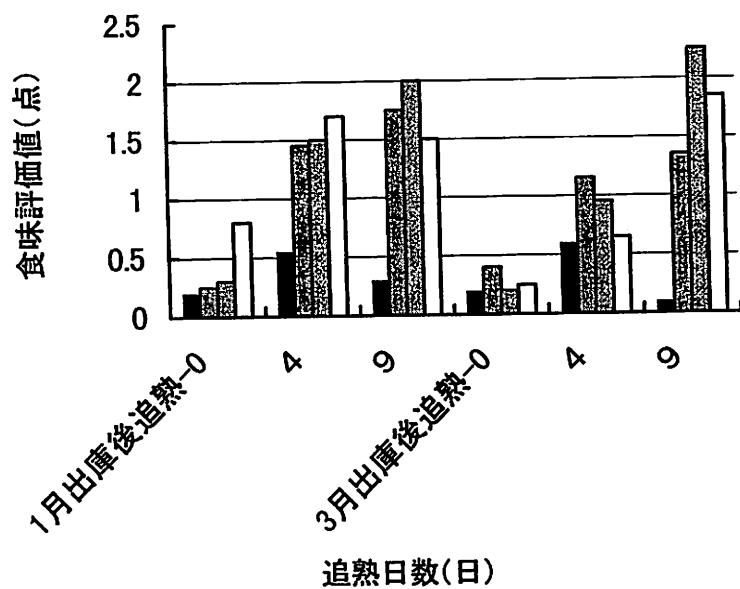


図2.1-5 収穫時期の異なる果実の貯蔵後追熟による食味の変化

注) 1. 凡例は図2.1-3を参照

2. 食味評価スコア: 0; まずい、1; 普通、

2; 美味しい、3; 非常に美味しい。

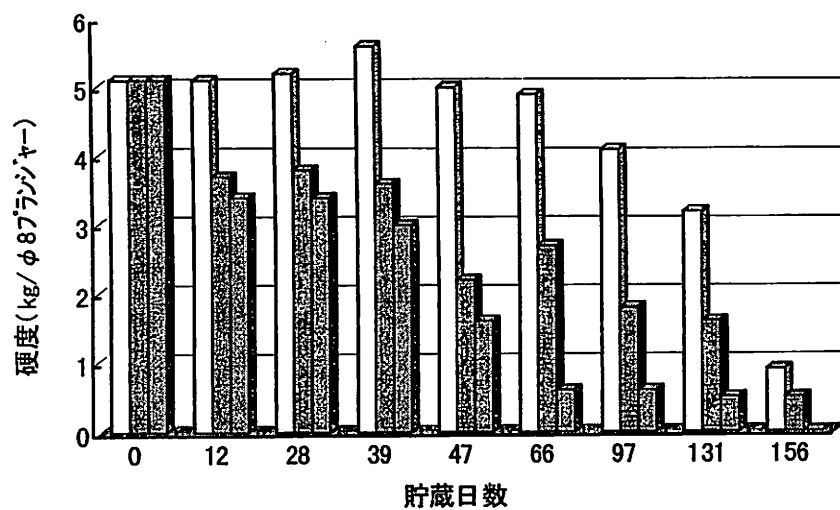


図2.1-6 貯蔵温度による果実硬度の変化

□ 0°C ■ 5°C ▨ 10°C

追熟後に高い糖度と適度な酸味を有し、食味に優れた高品質果実を得るための最適収穫時期を明らかにするために、収穫時期別の果実成分を測定するとともに、収穫時期別に低温貯蔵し、貯蔵後にエチレン追熟を行い、品質を調査した。樹上において、澱粉は収穫時期が遅くなるほど減少したが、全糖は逆に急増した。果実内のクエン酸は12月になってから、やや減少する傾向があった。これらの果実を収穫時期別にそれぞれ貯蔵し、エチレンで追熟を行った結果、高い糖度と適度のクエン酸を含有し、食味が良好な果実は12月上旬に収穫されたものであった。したがって、高品質果実を得るためには、現行の収穫時期である11月上旬をやや遅らせる必要のあることが明らかとなった。また、貯蔵温度は凍結しない限り低い方が良いことが判明した。

ン処理濃度50ppm、処理時間24時間、処理温度20℃の条件でエチレン処理を行った。その時の軟腐症の発生率を表2.2-1に示す。いずれの追熟温度でも追熟は速やかに進行したが、エチレン除去後の追熟温度が25℃では軟腐症が多発している。また、20℃では貯蔵1ヵ月の果実では軟腐症の発生は比較的少ないが、貯蔵2ヵ月では多発した。これに対し、15℃では発生がほとんど抑制された。したがって、軟腐症の発生を抑制しながら果実を追熟させるためには、エチレン除去後の追熟温度は15℃が適当であると考えられる。

エチレン処理温度が軟腐症の発生と追熟促進に及ぼす影響を明らかにするために、エチレン処理濃度0及び50ppm、処理時間24時間、処理温度15、20及び25℃の条件でエチレン処理を行い、エチレン除去後の追熟温度を軟腐症の発生が抑制できる15℃に設定して、追熟を行った時の果実硬度の変化を図2.2-1に、その時の軟腐症発生率を表2.2-2に示す。全追熟期間に比べれば前処理とエチレン処理の合計は48時間という短期間でありながら、エチレン処理時の温度が異なるだけで、その後の追熟促進に大きな影響が現れ、エチレン処理時の温度が高い方が果実硬度は速やかに低下している。さらに、エチレン処理温度25℃では、追熟処理後期に軟腐症が増加している。軟腐症の発生がかなり抑えられるはずのエチレン除去後の追熟温度15℃においても、エチレン処理温度25℃の場合には軟腐症が多発したことは、前処理とエチレン処理の合計が48時間という短期間にも係わらず、病原菌が急速に増殖したためと考えられる。以上の結果より、エチレン除去後の追熟温度を15℃で行う場合、エチレン処理温度15℃では果実硬度の低下が遅く、25℃では軟腐症の発生が多くなることから、エチレン処理時の温度は20℃付近が適当であると思われる。

エチレン処理濃度が追熟促進に及ぼす影響を明らかにするために、エチレン濃度0～50ppm、処理時間24時間、処理温度20℃の条件でエチレン処理を行い、エチレン除去後は15℃で追熟を行った時の果実硬度の変化を図2.2-2に示す。エチレン処理により果実硬度は速やかに低下し、エチレン濃度が高いほど効果が高い。追熟果実の食味と食感は、エチレン濃度50ppmで追熟を行ったものが最も優れていた。なお、エチレン濃度50ppm以上では追熟促進効果に差が認められなくなったことから、このようなエチレン処理の温度条件下では追熟促進は50ppm程度で上限に達するものと考えられる。

平成12年度において福岡県産キウイフルーツの5割を占めるようになった追熟出荷ブランド果実「博多甘熟娘」の追熟条件には、エチレン濃度50ppm、エチレン処理温度17℃、追熟温度17℃が設定されている。

表2.2-1 追熟9日後の軟腐症発生率

エチレン除去後の 追熟温度(℃)	発生率(%)	
	低温貯蔵1ヵ月果実	低温貯蔵2ヵ月果実
15	3	6
20	22	62
25	92	85

注) 1. エチレン処理濃度は50ppm、処理温度は20℃。

2. 調査果実数は15℃と20℃では50果、25℃では26果。

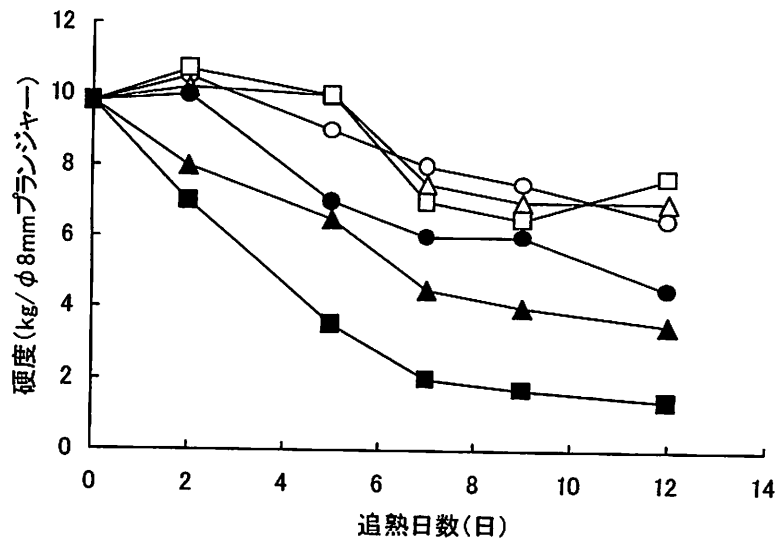


図2.2-1 エチレン処理温度と果実硬度

○—0ppm-15°C △—0ppm-20°C □—0ppm-25°C
 ●—50ppm-15°C ▲—50ppm-20°C ■—50ppm-25°C

表2.2-2 追熟12日後の軟腐症発生率

エチレン処理 温度(°C)	エチレン濃度 (ppm)	発生率 (%)
15	0	0
	50	3
20	0	7
	50	7
25	0	3
	50	27

注) 1. エチレン除去後は15°Cで追熟。

2. 調査果実数は30果/区。

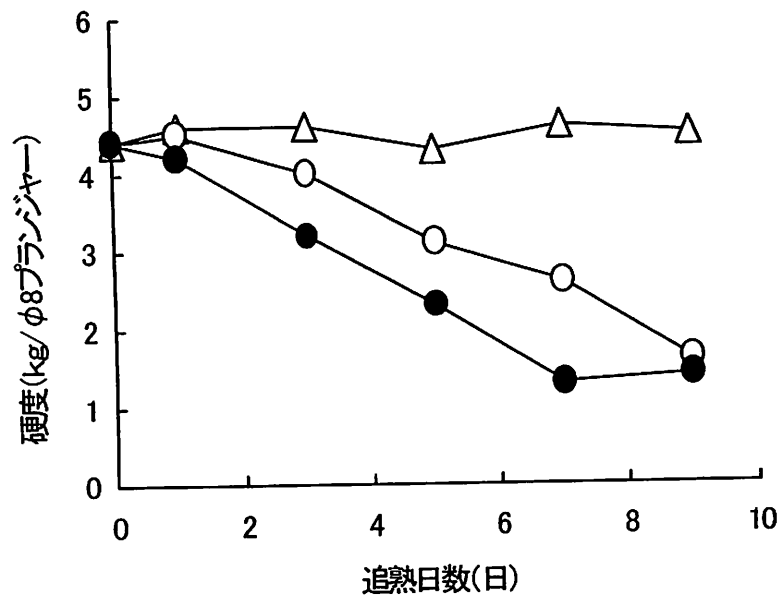


図2.2-2 エチレン濃度と果実硬度

—△— 0ppm —○— 2ppm —●— 50ppm

2.2.4項 小 括

キウイフルーツ‘ヘイワード’を0℃貯蔵庫から出庫し、エチレン処理濃度、処理温度及びエチレン除去後の追熟温度が軟腐症の発生や果実品質に及ぼす影響を調査した。エチレン除去後の追熟温度が20℃以上になると軟腐症の発生が多くなったが、15℃にすると発生が抑制された。果実はエチレンが存在する環境下に置かれることにより、追熟が促進された。追熟はエチレン処理時及びエチレン除去後の追熟温度が高いほど促進され、果実硬度は低下した。

軟腐症の発生を抑えながら、食味の優れた果実に熟させるための追熟条件は、エチレン処理濃度50ppm、処理温度20℃で24時間処理を行い、エチレン除去後に15℃で追熟させることであった。

第3章 酵母を用いたバイオリアクターによる果実酒の連続生産

福岡県はキウイフルーツや甘カキの生産量が全国でもそれぞれ第2位及び第1位という産地であるが、キウイフルーツは全国的生産量の急増のために、またカキは長期貯蔵の困難さのために、生食以外の有利な加工利用のための用途開発が望まれている。

一方、国内のブドウを原料にしたワイン需要は全アルコール飲料の1%程度であるが、最近では市場規模が拡大している。食の洋風化、多様化志向の中で今後はブドウ以外の農産物を原料にした果実酒も消費が伸びていくものと思われる。

そこで、キウイフルーツやカキを原料にした新しい加工利用を図るために、最近、ビール醸造やエタノール生産では実用化されている酵母を固定化したバイオリアクターを果実酒の連続生産へ応用することを試みた。

3.1節 有機酸添加によるpH調整が果汁のろ過速度と生成果実酒の品質に及ぼす影響

3.1.1項 序 文

バイオリアクターで果実酒を生成するためには、供給する原料はもろみより果汁の方が望ましい。さらに、生成される果実酒の品質も、もろみを使用して発酵した後に清澄化したものよりも、発酵前に清澄化して醸造した果実酒の方が香気がフルーティで味もまろやかなものができる (HEATHERBELLら 1980)。

しかし、カキ果実は酸含量が低くpHが高いために、搾汁と清澄ろ過のために使用するペクチナーゼ等の酵素が活性を発揮できず、搾汁が極めて困難である。

そこで、カキに数種の有機酸を添加することによりpHを低下させ、酵素により搾汁を容易にするとともに、得られた搾汁液を用いて生成した果実酒の品質を評価した。さらに、キウイフルーツから得た搾汁液を用いた果実酒の生成も行った。

3.1.2項 実験方法

甘カキは‘富有’を原料とし、皮と種を除いた後、ホモジネートしながらクエン酸を添加してpH調整したホモジネート果実をろ過試験に用いた。これにペクチナーゼ (田辺製薬 (株) 製) を0.01%添加したものを10mlづつ試験管に分注し、40℃でインキュベートした。搾汁の難易度は、No.2ろ紙 (ADVANTEC 東洋 (株) 製、φ90mm) にホモジネート果実を注ぎ、0.5gのろ過果汁が得られる時間を測定することによって表した。

カキ酒の製造では、雑菌の増殖抑制のためにピロ亜硫酸カリウムを0.01%、ペクチナーゼ (田辺製薬 (株) 製) を0.01%添加し、さらに数種類の有機酸添加によりpH3.7に調整し、それぞれ破碎後、室温 (15℃) で20時間放置後、吸引しながらセライトろ過して清澄果汁を得た。この清澄果汁にスクロースを添加しBrix24に調整したものを、発酵管を取り付けた300 ml容三角フラスコに190mlづつ分注し、同じ清澄果汁で前培養したワイン用酵母IFO 2260を10ml添加して20℃で静置発酵させた。生成エタノール濃度は、炭酸ガスの発生に伴う重量減少から換算した。発酵終了後の果実酒は5℃で2週間冷蔵しただけで、熟成は行わず、官能評価に供試した。

なお、キウイフルーツはエチレンで追熟した‘ヘイワード’を用いて有機酸の添加は行わず、カキと同様に酵素処理の後、清澄化し、同じ清澄果汁で前培養したワイン用酵

母IFO 2260を添加して果実酒を生成した。

3.1.3項 結果及び考察

インキュベート4時間後に、クエン酸添加でpH3.5～4.5に調整したカキホモジネートから、ろ過果汁0.5gが得られる時間を表3.1-1に示す。ペクチナーゼを添加しないものは、いずれのpHにおいても、ろ過開始 5分経過したときのろ液が0.5gに到達していない。これに対し、ペクチナーゼを添加したものは、すべて5分以内にろ過果汁0.5gが得られ、ホモジネートのpHがpH3.5に近づくほどろ過時間が短くなった。したがって、pHを3.5に調整するとろ過、すなわち搾汁が容易になるが、一般的なワインの原料であるブドウ果汁は、pHが3.7付近にあり酒石酸が主な酸であるため、pH3.5にクエン酸で調整した果実酒は酸味が強すぎるとともに、酒質に違和感が生じることが懸念される。そこで、酸味是一般的なワインと同程度のpH3.78に設定し、添加する有機酸の種類を変えて発酵を行った。発酵の経過に伴うエタノール濃度の推移と発酵終了後の果実酒の品質を表3.1-2に示す。いずれの種類有機酸を添加しても、エタノールは順調に生成された。

5名のパネラーによる官能評価の結果、最も評価が高かった果実酒は酒石酸添加であり、次にクエン酸添加及びクエン酸と酒石酸混合添加が続いた。酒石酸添加の果実酒は、薄い黄色でブドウ酒様の味覚とまろやかさを備えていた。しかし、リンゴ酸を添加した果実酒は苦みが感じられ、評価が低かった。

これらの結果から、カキ果汁のpH調整に酒石酸やクエン酸を用いると、ろ過搾汁が容易になるとともに醸造後に官能評価の高い果実酒が得られることがわかった。この結果をもとに、(株)ふくれんジュース加工工場ではカキを酒石酸添加により搾汁し清澄化した果汁を(株)巨峰ワインに出荷し、(株)巨峰ワインではこの果汁を原料にカキ酒を製造し、「柿ワインはかた」として販売している。

なお、キウイフルーツ果汁を用いた発酵はカキ果汁よりも遅く、26日で約9%のエタノールが生成した。しかし、生成された果実酒は果実特有の香りは保持しているものの、酸味が強すぎることと、糖分が消失したことに伴い果実に含まれるキナ酸が独特なえぐみを呈し、評価は低かった。キウイフルーツ酒の醸造には、何らかの方法により酸を低減させた果汁を原料に用いる方が好ましいものと思われる。

表3.1-1 カキホモジネートのpH調整に伴うろ過時間の変化(秒/0.5g果汁)

酵 素	pH					
	3.50	3.75	4.00	4.25	4.50	5.38(原果汁)
無添加	>300	>300	>300	>300	>300	>300
添加	27	43	66	103	166	283

注) >300は0.5gのろ過果汁を得るのに5分以上要したことを表す。

表3.1-2 カキ果汁の発酵に伴う生成エタノール濃度(%)と果実酒の官能評価

添加した 有機酸	発酵日数(日)			官能評価
	3	5	14	
クエン酸	2.5	6.0	12.4	+
酒石酸	1.7	5.5	12.1	++
リンゴ酸	3.2	7.0	13.9	-
クエン酸+酒石酸(1:1)	2.7	5.4	12.3	+
酒石酸+リンゴ酸(1:1)	3.0	6.3	12.9	-
クエン酸+リンゴ酸(1:1)	2.6	5.9	12.5	-
クエン酸+酒石酸+リンゴ酸(1:1:1)	3.9	8.5	14.1	±

注) 官能評価スコア: 非常に良い; ++, 良い; +, 普通; ±, 悪い; -。

3.1.4項 小 括

ペクチナーゼによるカキのろ過搾汁を容易にするとともに、官能評価の高い果実酒に仕上げるためには、添加する有機酸は酒石酸、もしくはクエン酸が適した。酒石酸を添加して生産したカキ酒は、薄い黄色でブドウ酒様の味覚とまろやかさを備えていた。しかし、キウイフルーツの果汁を用いて醸造した果実酒は、キウイフルーツ独特の香りは保持しているものの、強い酸味とキナ酸の渋みが残し、評価は低かった。

3.2節 固定化酵母を用いたキウイフルーツ酒、カキ酒の連続生産

3.2.1項 序 文

キウイフルーツやカキ果汁を原料にワイン酵母で回分式アルコール発酵を行うことにより、果実の特性を保持した果実酒が醸造できることが明らかになった。特に、カキ果実は搾汁時にpH調整のために酒石酸またはクエン酸を添加することにより、ろ過搾汁が容易になり、発酵終了後の風味も優れることが判明した。そこで、品質の安定した果実酒を効率的に生産するために、固定化酵母を用いたバイオリアクターによる連続発酵を行った。

3.2.2項 実験方法

果汁の調整はキウイフルーツ‘ヘイワード’及び甘カキ‘富有’を原料とし、雑菌の増殖抑制のためにピロ亜硫酸カリウムを0.01%、ペクチナーゼ(田辺製薬(株)製)を0.01%添加し、さらにカキは破砕後、クエン酸添加によりpH 3.5に調整し、室温(15℃)で20時間放置し、遠心分離して果汁を得た。カキを酒石酸でpH調整を行うと、連続発酵の過程で酒石酸の結晶が析出し易いため、クエン酸とした。キウイフルーツ果汁は酸味低減のために脱イオン水で2倍に希釈した後、それぞれ果汁にスクロースを添加し

Brix20とした。原果汁及び改質果汁の分析値を表3.2-1に示す。

酵母は日本醸造協会ブドウ酒酵母9号（K-9）を使用し、その培養はクエン酸でpH3.5に調整し、滅菌したMY培地（グルコース10g、ペプトン5g、酵母エキス3g、麦芽エキス3g、蒸留水1l）に1白金耳接種し、20℃で48時間静置培養した。

固定化酵母はアルギン酸カルシウムゲルを用いた。直径3～4mmのゲルビーズを調製し、合成培地（スクロース150g、カザミノ酸3g、L-トリプトファン20mg、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g、 KH_2PO_4 3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5g、 CaCl_2 0.5g、蒸留水1l）を用いて20℃で24時間前培養した。

連続発酵は流動層型のリアクターを用い、溶存酸素（DO）濃度を制御しながら下部より通液と通気を行い、生成果実酒を上部から溢流させる方式とした。固定化酵母はリアクター容積の30%相当量を装填し、果汁の滞留時間を変化させながら連続発酵を行った。温度は15℃で、通気は CO_2 ガスを100ml/minの流速で行い、ゲルのガスによる攪拌を行った。

糖の分析には高速液体クロマトグラフ（島津製作所（株）製LC-3A）を、エタノールの分析にはFID付ガスクロマトグラフ（島津製作所（株）製LC-6A）を、有機酸の分析にはカルボン酸分析計（盛進製薬（株）製S-700）を用いた。エキス分、酸度及び着色度は第三回改正国税庁所定分析法注解に従い、菌数と菌染色率はトーマの血球計測器を用いた。固定化酵母は1Mリン酸緩衝液（pH6.5）によってゲルを溶解し、得られた菌の染色はメチレンブルー法により行った。

3.2.3項 結果及び考察

発酵は開始から7日間はバッチで行い、その後滞留時間を変えながら43日間の連続発酵を実施した。カキ果汁を用いた場合の生成果実酒のエタノール濃度、糖濃度および担体外漏出菌数の経過を図3.2-1に示す。バッチ発酵（Ⅰ）後、滞留時間（RT）12時間（Ⅱ）で果汁を通液したところエタノール濃度は約7%まで低下した。そこで、RT40時間（Ⅲ）とし、エタノール濃度を11%にあげ、RT24時間（Ⅳ）にしてもエタノール濃度に変動が生じなかったので、再びⅡに戻し、エタノール濃度が11%に維持されることを確認した。ここまでに28日を要した。その後、RT2.6時間（Ⅴ）及びRT6時間（Ⅵ）において、それぞれエタノール濃度7%、10%のカキ果実酒を安定して得た。全糖の消費量に基づくエタノール収率は85～90%、エタノール生成速度は滞留時間12、6、2.6時間でそれぞれ7.5、13.4、21.6g/l・hであった。漏出菌数は32日目で約 2×10^8 cells/mlとほぼ一定となった。雑菌汚染の指標となる乳酸、酢酸は発酵期間中増加せず、ジアセチルの出発物質とされるピルビン酸の含有率も低く抑えられ、癖のない、さっぱりとした仕上がりのカキ果実酒となった。

また、キウイフルーツ果汁について同様に行った試験結果を図3.2-2に示す。バッチ発酵期（Ⅰ）における発酵の立ち上がりはカキの場合より早かったが、連続発酵移行後の経過は同様に推移した。RT12時間（Ⅱ）及びRT6時間（Ⅵ）において、それぞれエタノール濃度11%、10%のキウイフルーツの果実酒を安定して得た。独特なえぐみと強い苦味を持つキナ酸は発酵開始後約20%減少したが、その後はほとんど変化がなかった。

連続発酵試験で得られた両果実酒の甘口タイプ（エタノール濃度9～10%、糖濃度30～40g/l）と辛口タイプ（エタノール濃度11～12%、糖濃度0～10g/l）について12名のパネラーにより官能評価を行った。結果を表3.2-2に示す。カキ酒はいずれもさっぱりとした酒質であった。甘口タイプはカキ原料臭がやや感じられるが、甘味と酸味とエタノール濃度のバランスが高い評価を得た。辛口タイプは日本酒様の香味ではあるが、果

実酒としての特徴に欠けると評価された。キウイフルーツ酒は、いずれも果実原料の香りを残していた。甘口タイプは酸味とエタノール濃度との調和が高い評価を得た。辛口タイプは酸味とえぐみが強く、評価が低かった。これらのことから、カキ及びキウイフルーツを原料にした果実酒は、エタノール濃度を9～10%程度に抑えて、糖濃度を30～40g/l程度残した甘口タイプが適していることが示唆された。

表3.2-1 原果汁と改質果汁の分析値

	カ キ		キウイフルーツ	
	原果汁	改質果汁	原果汁	改質果汁
Brix	16.0	20.0	13.8	20.0
pH	4.50	3.50	3.60	3.65
糖組成 (g/l)				
フルクトース	65.0	63.0	45.5	21.5
グルコース	70.0	68.5	40.0	20.2
スクロース	0	56.5	5.0	143.3
有機酸組成 (g/l)				
リンゴ酸	1.4	1.5	2.2	1.0
クエン酸	0.6	2.8	10.6	5.1
キナ酸	0	0	10.8	5.5

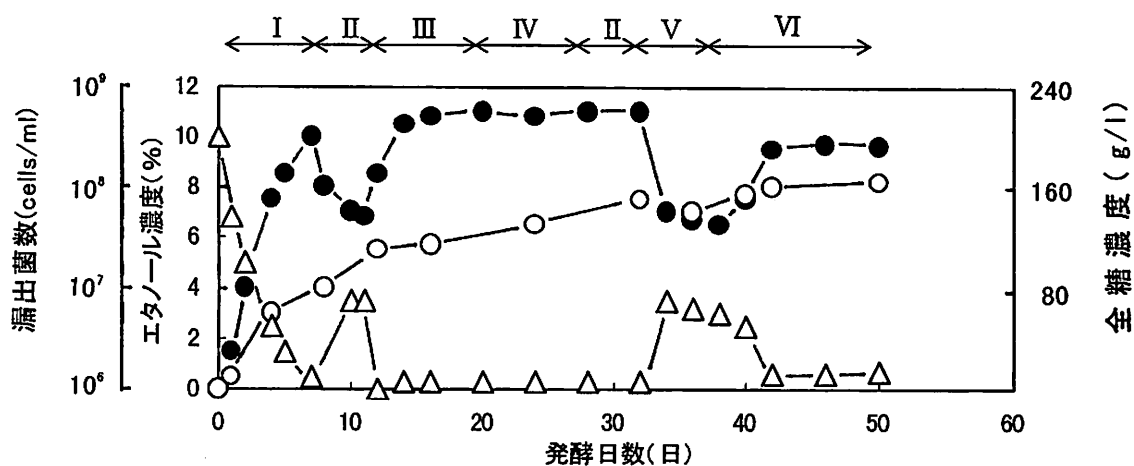


図3.2-1 固定化酵母を用いたカキ酒の連続発酵

●エタノール ○漏出酵母数 △全糖

I: 前培養、II: 滞留時間12h、III: 滞留時間40h、IV: 滞留時間24h

V: 滞留時間2.6h、VI: 滞留時間6h

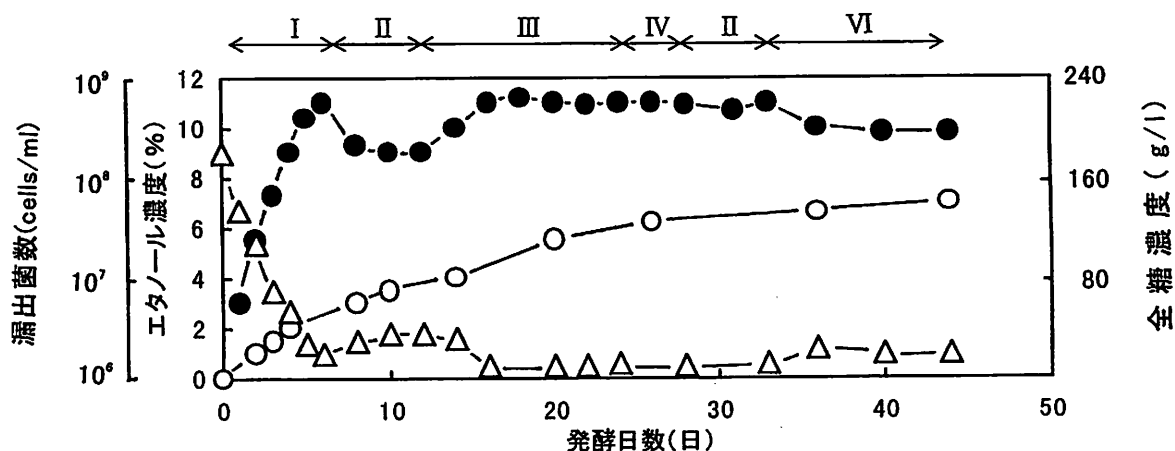


図3.2-2 固定化酵母を用いたキウイフルーツ酒の連続発酵

●エタノール ○漏出酵母数 △全糖

注) I ~ IVは図3.2-1と同じ

表 3.2-2 果実酒の官能評価

原料果実	タイプ	官能評価値	酒 質
カキ	Sweet	1.6	すっきりして、バランス良好
	Dry	2.3	すっきりしているが、日本酒様の味
キウイフルーツ	Sweet	1.8	フルーティ、香気良好
	Dry	2.4	酸っぱく、えぐみを感じる

注) 官能評価スコア: 1; 良い, 2; 普通, 3; 良くない。

3.2.4項 小 括

カキ、キウイフルーツの果汁を原料とする果実酒の連続発酵生産を行った。リアクターが定常状態に到達したときのエタノール濃度、及びエタノール生成速度は滞留時間12、6時間において、いずれの原料でもそれぞれ11、10%及び7.5、13.4g/l・hであり、雑菌の汚染なく50日間に渡って果実酒を醸造できた。これらのカキやキウイフルーツの果実酒は、エタノール濃度を9~10%程度に抑えて、糖濃度を30~40g/l程度残した甘口タイプが評価が高かった。

第4章 酢酸菌を用いたバイオリアクターによる果実酢の連続生産

酢酸発酵では、発酵液表面に酢酸菌皮膜を形成させ、数か月間かけて発酵させる静置発酵が古くから行われている。これに対し、より短期間で発酵を終了させるために、ブナ削片等の表面に酢酸菌を付着増殖させて発酵させるジェネレーターは一種の固定化微生物を用いたバイオリアクターと言えるものであるが、その生成速度もそれほど高くない。

近年、様々な担体に固定化した微生物を用いたバイオリアクターによる酢酸発酵の研究は著しく増加し、セラミックス、ポリプロピレン製綿状繊維、ポリプロピレン製ホローファイバー、 κ -カラギーナンゲル及びアルギン酸カルシウムゲルを用いた報告がされている (GHOMMIDHら 1982、OKUHARA 1985、NAMBARAら 1985、OSUGAら 1984、佐伯 1990)。しかし、これらのバイオリアクターによる酢酸発酵では、酢酸生成速度が高くても生成される酢酸濃度はせいぜい20~30g/l程度であったり、生成速度を算出する場合の容積を固定化担体まで含めたリアクター全容積当りに換算すると実際の生成速度はさほど向上していない場合もある。さらに、これらの報告はすべて合成培地を用いており、天然原料としてのキウイフルーツやカキ等の果実酒を原料に用いた果実酢の生産については報告がない。

そこで、バイオリアクターを用いて果実酢としてJAS規格に適合する酢酸濃度45g/l以上の酢を高い生成速度で、かつ長期間安定して連続的に生産するための研究を行った。

4.1節 通気攪拌連続発酵における酢酸生成に及ぼす酸素移動度の影響

4.1.1項 序 文

固定化酢酸菌を利用するバイオリアクターの形態を模索するために、遊離の酢酸菌を用いて、通気攪拌による連続発酵を行った。生産速度と酸素供給の関係について明らかにするために、酢酸生成速度と希釈率及び酸素移動度 (K_La) の関係について検討を行った。

4.1.2項 実験方法

酢酸菌株は *Acetobacter aceti* IF0 3283 を使用した。

種培養の培地には YPG1% 合成培地 (粉末酵母エキス10g/l、ポリペプトン10 g/l、グルコース10g/l、エタノール2%) を用いた。種培養は直径18mmの試験管に YPG1% 合成培地10mlを入れ、保存菌株スラントから1白金耳を接種し、32℃で4日間静置培養した。

前培養の培地には YPG0.2% 加酸合成培地 (粉末酵母エキス2g/l、ポリペプトン2g/l、グルコース2g/l、エタノール7%、酢酸10.7g/l、酢酸ナトリウム4g/l) を用いた。前培養はこの YPG0.2% 加酸合成培地200mlに種培養液10mlを添加し、32℃で往復振とう培養を行った。

連続発酵本培養は1000ml吸引ろ過ビン (実容量1400ml) を利用して試作したリアクター (図4.1-1) を用い、YPG0.2% 加酸合成培地1200mlに、前培養菌液200mlを添加し、32℃で通気量を変えて発酵を行った。通気はろ過ビン上部から供給し、下部で放出させ、通気管の出口には液体クロマトグラフ用のサクシオンフィルター (孔径5 μ m) を取り付けて、通気を微細な泡にして培地中に放出した。連続発酵の開始は、酢酸濃度が40g/l

に到達したときにペリスターポンプを作動させて行い、YPG0.2%加酸合成培地の供給流量を変化させ、定常状態に到達したときの希釈率と酢酸生成速度、酢酸濃度及び酢酸比生成速度を調べた。また、連続発酵中に通気量を変化させることにより、JAS規格で果実酢として最低必要濃度と規定されている酢酸濃度45g/lの発酵液を生産するときの希釈率とKLaの関係についても検討した。

発酵液中の酢酸濃度は0.1N-NaOHで滴定し、酢酸に換算した。溶存酸素はリアクター内にクラーク型隔膜ポーラログラフセンサーを挿入し、溶存酸素計(YSI製54A)で測定した。酸素移動容量係数(KLa)はGassing out法で算出した。

菌数は660nmで濁度を測定し、乾燥菌体重量に換算した。

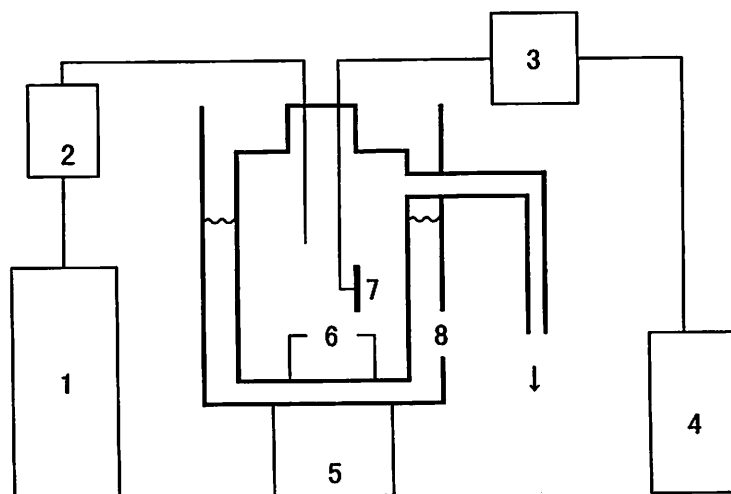


図4.1-1 通気攪拌式リアクターの概略

- 1: 培地、2: ペリスターポンプ、3: エアーフィルター
4: エアーポンプ、5: スターラー、6: 攪拌子、
7: サクションフィルター、8: 恒温水槽

4.1.3項 結果及び考察

通気攪拌連続発酵において定常状態に到達したときの希釈率に対する培養液中の酢酸生成速度、酢酸濃度及び酢酸比生成速度の変化を図4.1-2に示す。

定常状態はリアクターに対して容積の3倍以上の培地の流入出があっても、リアクター内の酢酸濃度と菌数（濁度）が一定に保持されていたときと定義し、この状態に達するまではそれぞれの希釈率において14日以上を要した。

希釈率を減少させるにつれて、酢酸比生成速度は最初から、酢酸生成速度は酢酸濃度約45g/lを越えたところから急激に減少した。これに対し、酢酸濃度は急激に増加しながらも酢酸濃度約45g/lを越えたところから、その増加程度は小さくなり、やがて54g/l濃度付近で一定になった。この酢酸濃度の増加停止は、蓄積した酢酸により酢酸菌の酸生成が徐々に阻害されたものと考えられる。

さらに、通気（空気）量を変えて KLa を変化させた場合に、酢酸濃度 45g/l を生産するための希釈率について検討した。結果を図4.1-3に示す。通気量を増加させると、すなわち KLa を増加させると、酢酸濃度 45g/l を生産するときの希釈率もほぼ直線的に増加させることができた。このとき、溶存酸素濃度は通気量 1000ml/min ($KLa=6.6/\text{min}$) においても 2.5mg/l しかなく、溶存酸素律速（山下ら 1989）となっていたが、遊離の菌を使用しているにも拘わらず約 $3\text{g/l}\cdot\text{h}$ もの高い酢酸生成速度を達成した。酢酸菌は絶対好気性菌で、菌体の増殖に伴い酢酸が生成される増殖連動型に近い菌（森ら 1972、OSUGA ら 1984）であり、絶対好気性菌における生産物の生成速度は菌の旺盛な酸素需要を如何に満たすかにかかっている（清水ら 1987）と言われている。したがって、さらに KLa を増加させることにより、より高い希釈率でリアクターを安定して運転することができ、これに伴って酢酸生成速度がさらに高まることが予想できる。

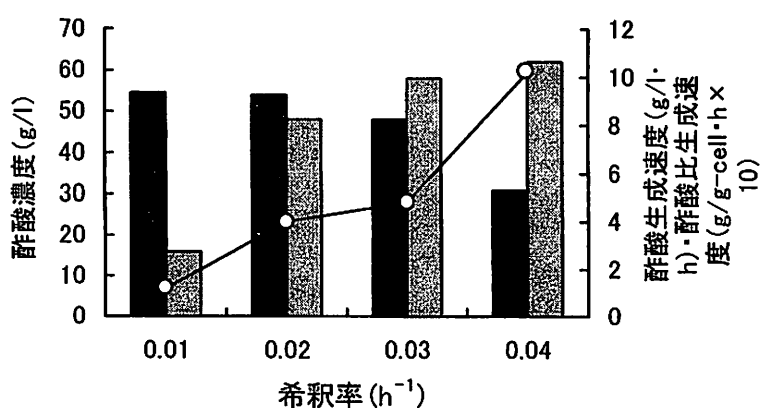


図4.1-2 通気攪拌連続発酵において定常状態に到達したときの希釈率との関係

■ 酢酸濃度 ▨ 酢酸生成速度 —○— 酢酸生成比速度

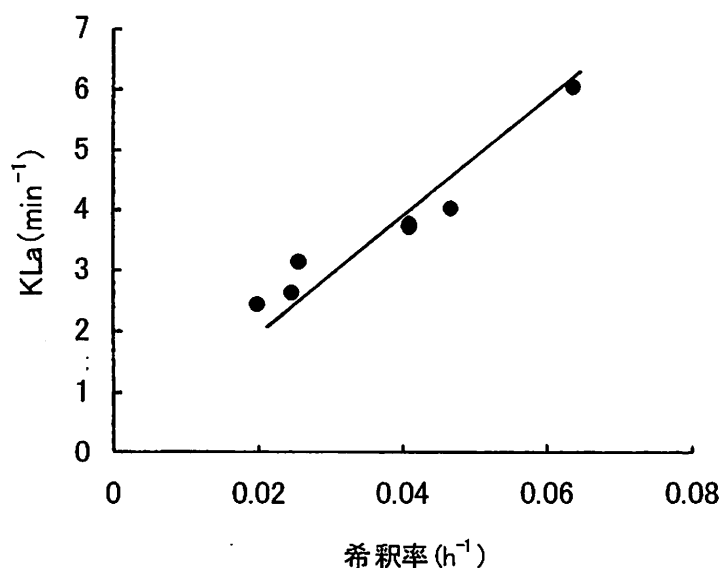


図4.1-3 通気攪拌連続発酵において酢酸濃度 45g/l が生産されるとき希釈率と KLa の関係

しかし、 KLa を増加させるためにさらに通気量を増加させると、発泡しにくい合成培地を用いているにもかかわらず、培養液中から気泡とともに酢酸菌がリアクター上部の器壁に集積し、最終的には培養液から菌が消失してしまう現象が起こった。これに対し、 KLa を増加させるために気泡をさらに微細化することはすでに限界であること、また、消泡剤を添加したり、攪拌速度を増加させたり、通気に酸素を使用したりすることは、果実酢として消費者ニーズや実用上の経済的コストを考慮すると好ましいものではない。さらに、リアクターから菌の消失を防ぐために菌を固定化することは、リアクター実容積が減少するだけでなく、 KLa の低下も懸念される。これらのことから、発泡しやすい果実酒を原料に用いて、通気攪拌式のバイオリアクターにより、さらに高い酢酸生成速度を達成することは困難であると思われた。

4.1.4項 小 括

通気攪拌連続発酵の定常状態においては、希釈率の減少に伴って酢酸比生成速度は最初から、酢酸生成速度は酢酸濃度約45g/lを越えたところから急激に減少した。これに対し、酢酸濃度は急激に増加しながらも酢酸濃度約45g/lを越えたところから、その増加程度は小さくなり、やがて54g/l濃度付近で一定になった。酢酸濃度45g/lを生産するとき、通気量を増加させることにより KLa を増加させると、希釈率をほぼ直線的に増加させることができ、これに伴って酢酸生成速度は向上した。しかし、試験した最大通気量である1000ml/min ($KLa=6.6/\text{min}$) においてもリアクター内の溶存酸素濃度は2.5mg/lしかなく、溶存酸素律速となっていた。

4.2節 静置発酵における酢酸生成に及ぼす酸素濃度の影響

4.2.1項 序 文

通気攪拌連続発酵において酢酸生成速度を向上させるためには、リアクター内の酢酸生成に関与する菌数を増加させるとともに、その増殖速度も増加させ、培地への通気に伴う KLa 値を増加させることにより溶存酸素濃度として必要な3mg/l (山下ら 1989) を維持し、増加した酢酸菌の需要に見合う酸素の供給を円滑に行いながら、希釈率を制御することが、酢酸生成速度の維持と酢酸の長期間の安定生産に必要であると考えられる。しかし、果実酢製造のためのキウイフルーツ等原料果実酒は通気により発泡しやすいため、通気攪拌式のバイオリアクターで高い酢酸生成速度を達成することは困難である。

そこで、高い酢酸生成速度と長期間の連続安定生産の特性を兼ね備えたバイオリアクターの形態を模索するために、培地中に通気を必要としない酢酸菌膜による静置発酵を行い、酢酸菌膜の酢酸生成速度と雰囲気酸素濃度の関係について検討を行った。

4.2.2項 実験方法

酢酸菌株は4.1.1項と同じ株を使用した。

培地は種培養にはYPG1%合成培地を、本培養にはYPG1%加酸合成培地（粉末酵母エキス10g/l、ポリペプトン10g/l、グルコース10g/l、エタノール6%、酢酸10.7g/l）を用いた。

種培養は直径18mmの試験管にYPG1%合成培地10mlを入れ、保存菌株スラントから1白金耳を接種し、32℃で4日間静置培養した。本培養は、直径86mmのシャーレに入れたYPG

1%加酸合成培地90mlに種培養液10mlを添加した後、32℃で36時間以上静置して液表面に菌膜が十分に生成し、酢酸濃度が25g/l以上に到達したときに容積2400mlのデシケーターに入れ、酢酸濃度が40g/lに達するまでの間、試験を行った。デシケーター内部の空間は底部に入れたマグネチックスターラーで攪拌し、酸素濃度の分析を行った。

菌膜による呼吸量は、デシケーター内の酸素濃度の減少をTCD付ガスクロマトグラフ（島津製作所製GC-8AIT、ポラパックQ 50/80 3m、モレキュラーシーブ 5A 80/100 2m、キャリアガス He 3kg/cm²、カラム温度80℃、インジェクション温度150℃）で測定した。発酵液中の酢酸濃度は0.1N-NaOHで滴定した。

4.2.3項 結果及び考察

デシケーター内の酸素濃度が菌膜の呼吸量と酢酸生成速度に及ぼす影響を図4.2-1に示す。デシケーター内の酸素濃度の減少から単位時間当たりの酸素の減少速度すなわち菌の実際の呼吸速度を、また単位時間当たりの酢酸濃度の増加から酢酸生成速度を算出した。デシケーター内の酸素濃度の減少に伴い、酢酸菌の呼吸量と酢酸生成速度の低下が認められる。菌膜表面の生菌数は一定であり、酢酸による菌の酢酸生成への阻害が無いと仮定して、酸素濃度と酢酸生成速度をLineweaver-Burksのプロットにより作図した。結果を図4.2-2に示す。

酸素濃度を制限基質としたときにYASUI ら（1978）は K_s （ミハエリス定数）=0.23 pO₂ atmであったと報告しているが、本試験では K_s =0.14pO₂ atm、最大酢酸生成速度0.22g/l・h（菌膜面積58cm²当り）が得られた。このことから、通気に空気をを用いた場合、菌膜1m²当りの酢酸生成速度は約23g/hと計算される。

もし、容積1lのリアクターに1m²の菌膜を充填固定できればその酢酸生成速度は23g/l・hとなることから、高くても10g/l・h程度の酢酸生成速度である最近の種々のバイオリアクターの中で最も生成速度に優れたバイオリアクターが開発できると考えられた。

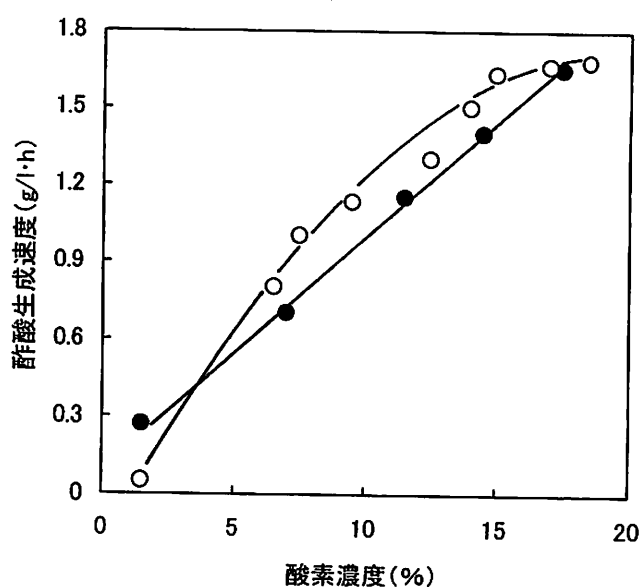


図4.2-1 酸素濃度が菌膜の酢酸生成速度と呼吸速度に及ぼす影響

● 酢酸生成速度 ○ 呼吸速度

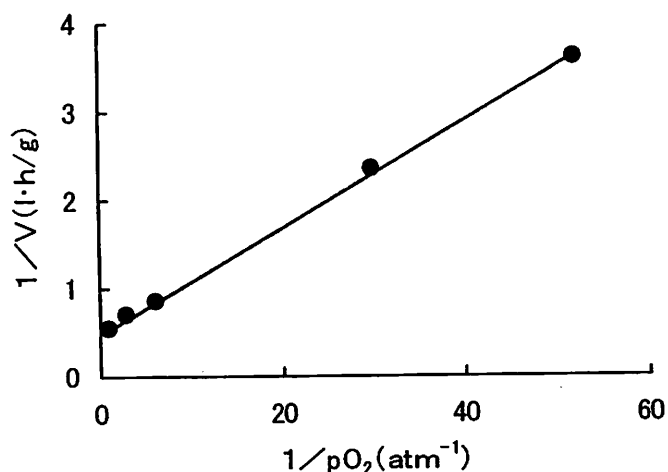


図4.2-2 酸素分圧(pO_2)と酢酸生成速度(V)の
Lineweaver-Burkのプロット

$$K_s = 0.14 pO_2 \text{ atm} \quad V_m = 0.22 \text{ g/l·h}$$

4.2.4項 小 括

酸素濃度を制限基質としたときに K_s (ミハエリス定数) $= 0.14 pO_2 \text{ atm}$ 、最大酢酸生成速度 0.22 g/l·h (菌膜面積 58 cm^2 当り) が得られた。また、通気に空気をを用いた場合、菌膜 1 m^2 当りの酢酸生成速度は約 23 g/h と計算された。

4.3節 木綿織布に固定化した酢酸菌による通気カラム式酢酸発酵

4.3.1項 序 文

遊離の菌体を利用した通気攪拌連続発酵においては、希釈率を高くすると菌の流出により菌数が低下し酢酸生成速度の低下を招く。したがって、高い希釈率でも菌の流出を防ぎ、リアクター内の菌数を高濃度に維持するためには、菌を担体に固定化する方法が一般的である。しかし、担体容積が大きいとリアクター内において発酵液が占める容積が少なくなり、実生産上の酢酸生成速度としてリアクター全容積当たりでこれを計算したときには極めて低い値になる場合がある。また、 KLa を増加させるために通気量や攪拌速度を増加させても担体が KLa の増加を妨害するとともに、増加した通気量に伴って発酵液の占める容積が低下する。さらに、攪拌速度を増加させたり、通気に酸素を使用することは、実用上の経済的コストを考慮すると好ましいものではない。

一方、容積 1 l のリアクターに 1 m^2 の菌膜を充填固定できればその酢酸生成速度は 23 g/l·h となり、既往の文献上、最も生成速度に優れたバイオリアクターが開発できると考えられる。さらに、攪拌操作が必要でなく、通気量を増やすことも問題にならないと考えられる。

そこで、高い生成速度と長期間の連続安定生産の特性を兼ね備えたバイオリアクターを開発するために、木綿織布を蛇腹状に折りたたんでカラムに縦に充填し、これに酢酸菌を付着させ、酢酸菌膜に空気中の酸素を直接摂取させる方式を考案した。

4.3.2項 実験方法

酢酸菌株、種培養培地及び種培養条件は4.1.1項と同様にした。増殖用及び連続発酵用培地にはYPG0.2%加酸合成培地を用いた。

連続発酵のためのリアクターは通気カラム式とした。このリアクターの菌の固定化のための担体には木綿製の織布を用い、長方形の織布を蛇腹状に折りたたんでカラムに縦詰めしに充填した。酸素の供給方式としては、通気中の酸素を菌体に直接摂取させる方式を採用した。図4.3-1に示すようなガラスカラム（総容積200ml、 $\phi 30 \times 285\text{mm}$ ）を用い、空気はエアーコンプレッサーにより、培地は0.2%加酸培地をペリスターポンプによりそれぞれ上部から供給し、下部から流出させた。また、通気はカラム上部からだけではなく、5cm毎に針穴を設けたシリコンチューブ（長さ55cm、直径4mm）を織布に包み込んでカラムに充填し、カラム全体に通気を分散させる操作も行った。通気量はカラムから排出される時の酸素濃度が17%以上を保持するように150~350ml/minに設定し、温度制御は30℃に設定した強制通風方式のインキュベーターにカラムを入れることにより行った。

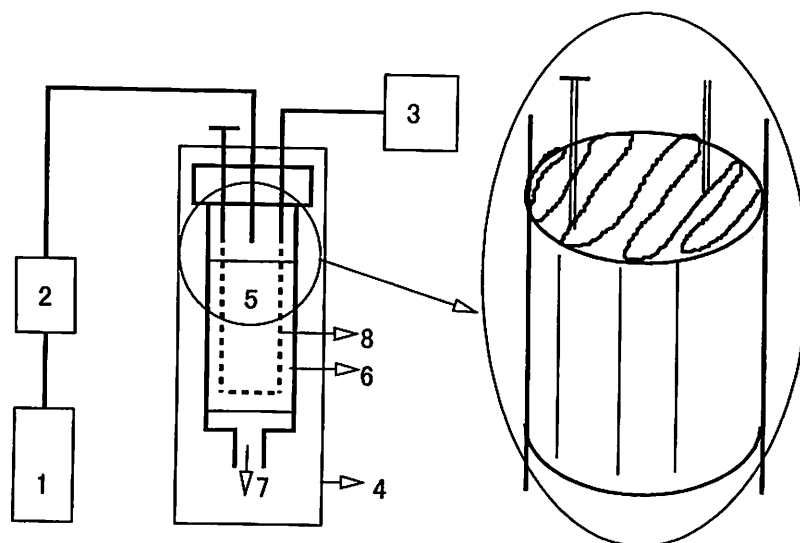


図4.3-1 通気カラム式バイオリアクターの概略

- 1 : 培地、2 : ペリスターポンプ、3 : エアーコンプレッサー
4 : インキュベーター、5 : 木綿製織布、6 : ガラスカラム
7 : エアーと培地の排出、8 : 針穴を設けたシリコンチューブ

菌の木綿織布への固定化には、500ml容三角フラスコに分注した増殖用 YPG 0.2%加酸合成培地100mlに培養した種培養液10mlを添加し、32℃で36時間往復振とう培養を行ったものを増殖培養液として使用した。固定化はカラムに充填した織布の上部からこの増殖培養液200mlを流し込み、下部から流出させることにより自然吸着固定を行った。

カラムの下部から排出されるガス中の酸素濃度はTCD付ガスクロマトグラフ（島津製作所GC-8AIT型）により測定した。酸度は0.1N-NaOHで滴定し、酢酸として表示した。担体の保水量は、培地を流速 35ml/minで供給したときにカラム内の担体が飽和されるまでに要した液量とした。希釈率は担体の保水量から算出される滞留時間からだけではな

く、リアクターの実用上の性能を表示するためにカラム総容積200mlを用いた滞留時間からも算出し、それぞれ酢酸生成速度(P_1)、(P_2)の換算に使用した。すなわち、

$(P_1) = \text{培地供給流速} \div \text{保水量} \times \text{生成酢酸濃度}$

$(P_2) = \text{培地供給流速} \div \text{カラム総容積 (200ml)} \times \text{生成酢酸濃度}$ である。

4.3.3項 結果及び考察

カラムに充填する担体量を変え、希釈率を変化させながら連続発酵を行ったときのカラムの条件と酢酸生成速度を表4.3-1のNo.1～4に示す。

酢酸菌を吸着固定化するために濁度が $OD_{660} = 0.26$ の菌液を織布を通して流し込んだところ、織布のろ過作用による自然吸着固定により排出液では $OD_{660} = 0.07 \sim 0.11$ となり、固定化された菌は担体量が多いほど多かった。さらに、固定化された菌を増殖させるために培地流速24～28ml/hで連続発酵を行ったところ、どのカラムでも4～8日後に酢酸の生産が定常状態に達し、その時の酢酸濃度は49～60g/lであった。SAKURAIら(1989)は*Aspergillus niger*を用いた通気攪拌発酵によるグルコン酸の生産に不織布を使用し、担体を菌液に浸すだけで容易に菌が固定化され、安定した生産性が得られたことを報告しているが、酢酸菌の固定化には織布を用いると、菌液を流し込むだけで特別な固定化処理を行うことなく、容易に菌を固定化でき、固定化された菌の増殖も極めて良好であることが判明した。

担体上で菌が十分に生育し、酢酸濃度45g/lがカラムから排出されるとき酢酸生成速度(P_1)は、織布量が最も少ないNo.1が最も高く、49.7g/l・hという極めて高い値であった(表4.3-1)。しかし、保水量を基にした酢酸生成速度(P_1)は実用的ではないと考えられるので、担体を含めたカラムの総容積200mlを基にした酢酸生成速度(P_2)に換算した場合、担体の量、即ち表面積に比例して(P_2)は増加した。

表4.3-1 酢酸生成速度に及ぼす木綿織布量の影響

No.	木綿織布 (g)	織布の大きさ (cm)	保水量 (ml)	P_1 (g/l・h)	P_2 (g/l・h)
1	5.8	12.5 × 28.5	19	49.7	4.7
2	11.7	25.0 × 28.5	36	29.2	5.3
3	17.5	37.5 × 28.5	48	26.3	6.3
4	23.0	50.0 × 28.5	56	28.8	8.1

5	23.0	50.0 × 28.5	56	36.8	10.3
6	42.0	75.0 × 28.5	92	29.8	13.7

注) 1. No.5～6のカラムには空気分散用のシリコンチューブが有る。

2. 空気分散用のシリコンチューブには5cmごとに針穴が開けられている。

したがって、菌体への酸素の供給を阻害しないような通気方法に改良すれば、カラム内の担体表面積を増加させることにより、酢酸生成速度(P_2)はさらに増加すると考えられた。

そこで、カラム上部からの通気だけではなく、織布全体に通気できるように針穴を設けたシリコンチューブを担体と一緒に充填した。このときのカラムの条件を表4.3-1のNo.5と6に、また、これらの条件で一定の希釈率で培地を供給したときに定常状態に到達したときの酢酸濃度と酢酸生成速度(P_2)を図4.3-2に示す。通気法を改良した結果、カラムNo.4に比べてNo.5は酢酸生成速度(P_1)、(P_2)ともに向上している。また、織布をカラム容積限度までに充填したNo.6はNo.5に比べてどの希釈率でもさらに生産性が向上し、実用上の酢酸生成速度である(P_2)が $13.7\text{g/l}\cdot\text{h}$ と極めて高い速度を達成できたうえに、5ヵ月間の連続発酵においても安定して酢酸発酵が行われた。

森(1996)が表4.3-2にまとめた最近の種々のバイオリアクターによる酢酸生成速度の比較に引用されているこの酢酸生成速度は、その中でも飛び抜けて高い値を達成している。なお、カラム容積 200ml に対し、No.6の織布の裏と表の面積合計は単純でも 0.43m^2 であり、菌膜 1m^2 の最大酢酸生成速度 23g/h からはNo.6のカラムは約 $50\text{g/l}\cdot\text{h}$ の潜在能力があると推定されるため、さらに生成速度を向上させる余地は十分にあると思われる。

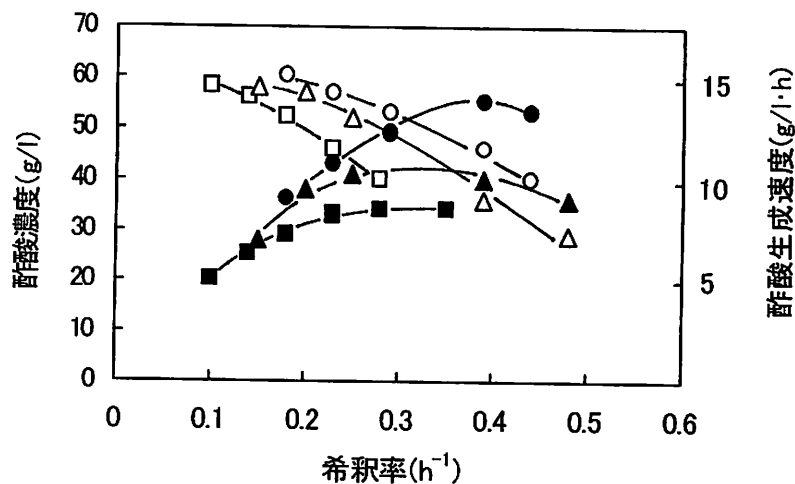


図4.3-2 連続生産の酢酸生成速度に及ぼす織布重量と通気改善の影響

- 織布23gの酢酸濃度
- △ 織布23g・チューブの酢酸濃度
- 織布42g・チューブの酢酸濃度
- 織布23gの酢酸生成速度
- ▲ 織布23g・チューブの酢酸生成速度
- 織布42g・チューブの酢酸生成速度

表 4.3-2 酢酸菌用ニューバイオリアクターの比較

方法または装置	担体等	流出液 酸度(g/l)	酢酸生成 速度(g/l・h)	希釈率 (h ⁻¹)	安定操作 期間(day)
凝集菌体法	TiO ₂ ・H ₂ O	69	5.0	0.072	61
気泡攪拌槽	κ-カラギナン	45	4.0	0.303	460
流動層カラム	アルギン酸カルシウム	45	7.2	0.111	10
仕切り板付きエアリフトⅠ	κ-カラギナン	31.9	6.0	0.294	170
仕切り板付きエアリフトⅡ	多孔質キトサン	33	9.3	0.370	21
構造物カラムⅠ	セラミックモノリス	34	4.6	0.100	270
構造物カラムⅡ	セラミックモノリス	39.3	4.37	0.154	30
構造物カラムⅢ	セラミックモノリス	81	1.69	0.0208	50
構造物カラムⅣ	セラミックアフロセル	53	6.5	0.128	100
充填層カラム	綿状繊維	75	2.6	(0.0425)	バッチ
膜モジュールカラム	ホローファイバー	30	0.2	0.01	30
回転円板	タオル布	55	0.23	(0.0042)	バッチ
【本法】	木綿織布	45	13.7	0.847	150

注) () はバッチタイムの逆数

(森 1996)

4.3.4項 小 括

織布を担体とした固定化酢酸菌を用いて、空気中の酸素を直接摂取させる通気カラム式のバイオリアクターによる連続発酵条件について検討した。酢酸菌は木綿製織布を通して流し込むだけで容易に固定化され、固定化後の担体上での増殖も良好であった。また、5ヵ月間以上安定的な酢酸発酵が可能であった。

合成培地を用いて酢酸濃度 45g/l が生産されるとき酢酸生成速度は最大 49.7g/l・hであり、担体容積まで含めたリアクター総容積当りに換算した場合でも最大13.7g/l・hにも到達し、極めて高い値であった。

4.4節 キウイフルーツ酒及びカキ酒を用いた通気カラム式酢酸発酵

4.4.1項 序 文

果実酢の生産を目的として、キウイフルーツ酒やカキ酒を原料に通気攪拌により浸漬培養を行うとただちに発泡が起こり試験の続行が不可能となる。この発泡は消泡剤を添加することにより抑制できるが、果実酢という食品を製造する場合には消泡剤の添加は好ましくない。

そこで、合成培地を用いた試験で極めて高い酢酸生成速度を達成した、木綿織布を担体とした固定化酢酸菌を用いる通気カラム式のバイオリアクターにより、キウイフルーツ酒やカキ酒を原料にした果実酢の連続生産を行った。

4.4.2項 実験方法

酢酸菌株、種培養培地及び種培養条件は4.1.1項と同様であり、増殖用培地及び果実酒に切り替えるまでの連続発酵用培地は4.3.1項のものと同一YPG0.2%加酸合成培地を用いた。また、連続発酵のリアクターは4.3.1項のものと同一ものを用い、その設定条件は表4.3-1のNo.5と同様であった。

連続酢酸発酵は、連続発酵用合成培地を用いて連続培養し、担体に酢酸菌が十分生育した後にキウイフルーツ酒、カキ酒の原料に切り替えた。

原料用キウイフルーツ酒の製造には、エチレンで追熟を行ったキウイフルーツ‘ヘイワード’に田辺製菓(株)製ペクチナーゼを0.1%加えて破碎し、30℃で15時間インキュベート後、セライトでろ過し、清澄果汁を得た。得られた果汁にワイン用酵母(IFO 2260)を接種し、25℃でアルコール発酵を行った。アルコール発酵が終了した後にセライトでろ過し、得られた清澄な果実酒(エタノール濃度6.1%、酸度10.6(試料10mlを中和するのに要する0.1N-NaOHのml)、糖濃度3.0g/l)を連続酢酸発酵の原料とした。

原料用カキ酒の製造には、甘カキ‘富有’を用いて5g/kg果実の割合でクエン酸を添加した後、キウイフルーツと同様に処理して、得られた清澄な果実酒(エタノール濃度8.7%、酸度7.2、糖濃度4.5g/l)を水で希釈(エタノール濃度6.1% 酸度5.0、糖濃度3.2g/l)し、連続酢酸発酵の原料とした。

4.4.3項 結果及び考察

表4.3-1のNo.5のリアクターを用いて、約6%エタノール濃度のキウイフルーツ酒、カキ酒を原料にして希釈率を変化させて定常状態に到達したときの酢酸濃度と酢酸生成速度の関係を図4.4-1に示す。合成培地を用いた図4.3-2の場合と比べて、いずれの原料でも酢酸生成速度は低下し、特にカキ酒の場合にその低下が著しかった。この酢酸生成速度の低下は、酢酸菌が増殖するための成分が酵母により消費され、原料酒には少なくなっていることとあわせて、種培養からリアクター内に十分に菌が生育するまでは合成培地を用いていたので、酢酸菌が合成培地に適応したためと考えられる。しかし、45g/l以上の酢酸濃度の果実酢が生成される時の酢酸生成速度(P_2)はキウイフルーツでは7.4g/l・h、カキでは5.2g/l・hであり、十分高い値であった。

担体に織布を使用し、空気中の酸素を直接、菌体に摂取させるこの方式では攪拌操作だけでなく、消泡処理も不必要となるうえに、菌の固定化が容易で高い生産性と長期安定性も確保できる。本方式はジェネレーターと基本的に同じ構造であるが、酸化速度が低いというジェネレーターの欠点を、担体に織布を使用し、それを蛇腹状に折りたたんで充填することにより改善することができた。したがって、織布を用いた通気カラム式のリアクターは、発泡性を有する果実原料等から消泡剤等を添加することなく効率的に食酢を生成することが可能であり、食酢の品質と生産性の向上に寄与するものと考えられる。

今後、通気に酸素を富化した空気を用い、表面積がより大きい担体を選定し、固定化された菌に酸素が十分に行き渡るような供給方法に改良することにより、さらに生産性を向上させることができると考えられる。

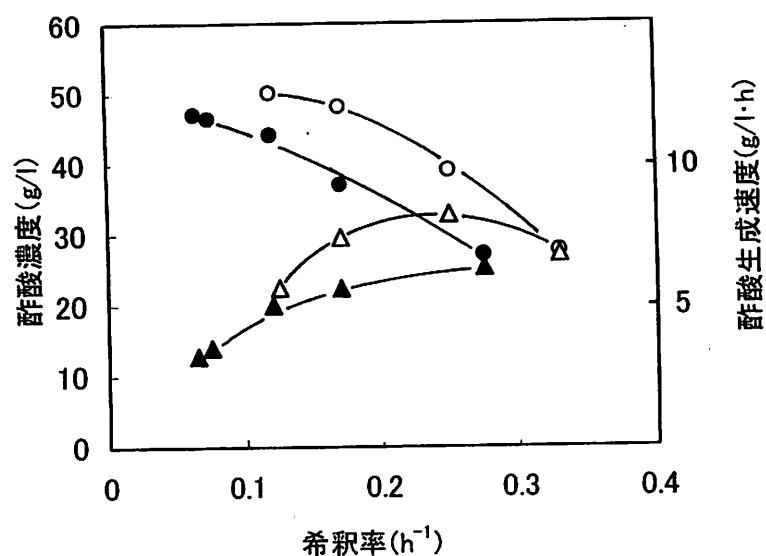


図4.4-1 連続発酵におけるキウイフルーツ酢とカキ酢の比較

○キウイフルーツ酢の酢酸濃度 ●カキ酢の酢酸濃度
 △キウイフルーツ酢の酢酸生成速度 ▲カキ酢の酢酸生成速度

4.4.4項 小 括

織布を担体とした固定化酢酸菌を用いて、空気中の酸素を直接摂取させる方式のバイオリアクターによるキウイフルーツ酢やカキ酢の連続発酵を行った。

果実酒から酢酸濃度45g/lの果実酢が生産されるときのリアクターの総容積当りの酢酸生成速度はキウイフルーツ酢では7.4g/l·h、カキ酢では5.2g/l·hであり、十分高い値であった。

この方式は攪拌操作だけでなく、消泡処理も不必要となるうえに、菌の固定化が容易で高い生産性も確保できる。

4.5節 カキ酒を用いた回転ドラム式酢酸発酵

4.5.1項 序 文

果実酢の生産を目的として、キウイフルーツ酒やカキ酒を原料に消泡剤を添加せずに通気攪拌により浸漬培養を行うとただちに発泡が起こり試験の続行が不可能となる。これを解決するために、原料に通気することなく空気中の酸素を直接、酢酸菌に摂取させる方式の木綿織布を担体にした通気カラム式バイオリアクターを開発した。

ここでは、同様に酢酸菌への酸素は直接空気中から摂取させ、培地成分だけは液体中から摂取させる方式を検討するために、シリコンラバーを担体とした回転ドラム式のバイオリアクターによる連続発酵を行った。

4.5.2項 実験方法

酢酸菌株は4.1.1項と同じものを用いた。種培養培地は4.1.1項と同じものを使用し、スラントから1白金耳の菌を種培養培地100mlに接種し30℃で17時間振とう培養した。この培養液にアルギン酸ナトリウム1gを加え、シリコンラバー（シリコン栓を5mm角に切断したもの）900mlに圧縮含浸させた後、2%塩化カルシウム溶液500mlを圧縮含浸させ、シリコンラバーにコートし固定化担体とした。

エタノール濃度の測定はガスクロマトグラフ（島津製作所GC6A）を、有機酸の測定はカルボン酸分析計（盛進製薬S-700）を、遊離アミノ酸の測定はウォーターズ600Eマルチベント送液システム、ウォーターズ分光光度計486型（254nm）及び PICO・TAGワイン分析カラム（3.9×300mm）を使用した。

原料用カキ酒の製造は、（株）ふくれんより提供を受けた糖濃度160g/lのカキ果汁を原料とし、3.2.2項のワイン用リアクターを用いて製造したカキ酒を連続的に供給した。発酵温度は10℃、カキ酒のエタノール濃度は6%とした。

酢酸菌を固定化したシリコンラバーを詰め込んだステンレス金網製ドラム（φ130×80mm、内容量900ml）3個を組み込んだ横型の隔室回転ドラム式バイオリアクター（溶液容量1200ml）を図4.5-1に示す。発酵は温度30℃、通気量1500ml/min、ドラムの回転数10rpmで行い、リアクター上部の空気相にエアーポンプを使用して無菌空気を送り込んだ。発酵は最初3日間を静置発酵で行い、以後 37日間は原料カキ酒を15ml/hの速度でポンプを用いて供給する連続発酵とした。

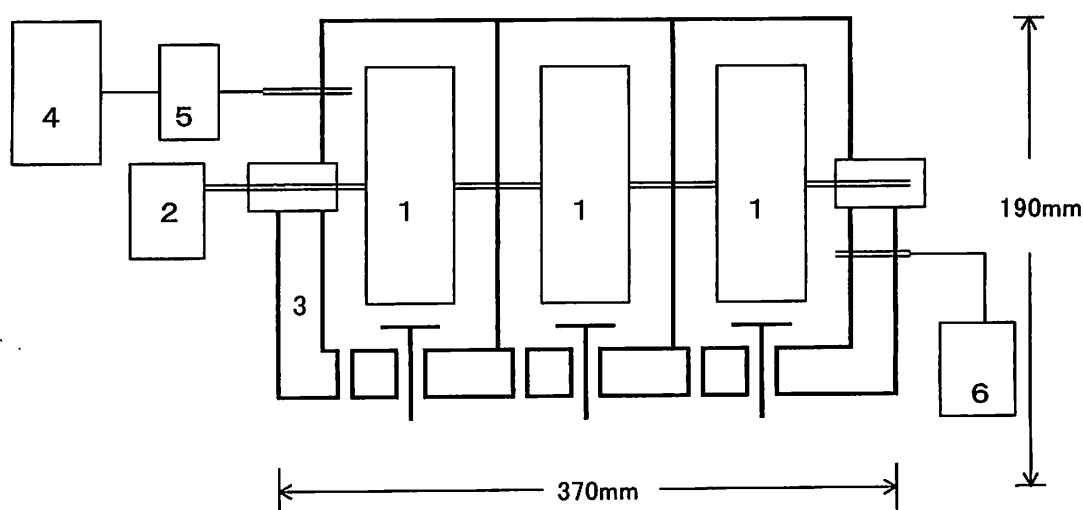


図4.5-1 回転ドラム式バイオリアクターの概略

- 1 : 回転ドラム、2 : モーター、3 : 恒温水槽、4 : 原料酒、
5 : ペリスターポンプ、6 : 生成果実酢

4.5.3項 結果及び考察

この酢酸発酵用リアクターを用いてカキ酒を原料とし、カキ酢の連続発酵を行ったときの酢酸濃度、エタノール濃度の変化を図4.5-2に示す。酢酸濃度は15日まで徐々に増加し、以後25日間は60g/l程度を安定して維持し、エタノール濃度は3日目以降0.3%以下で推移した。連続発酵が定常状態に到達し、酢酸濃度60g/lのカキ酢が生産されるときリアクターの総容積当りの酢酸生成速度は0.33g/l・hであり、高い酢酸生成速度ではなかったものの、40日間に渡り安定してカキ酢の生産ができた。

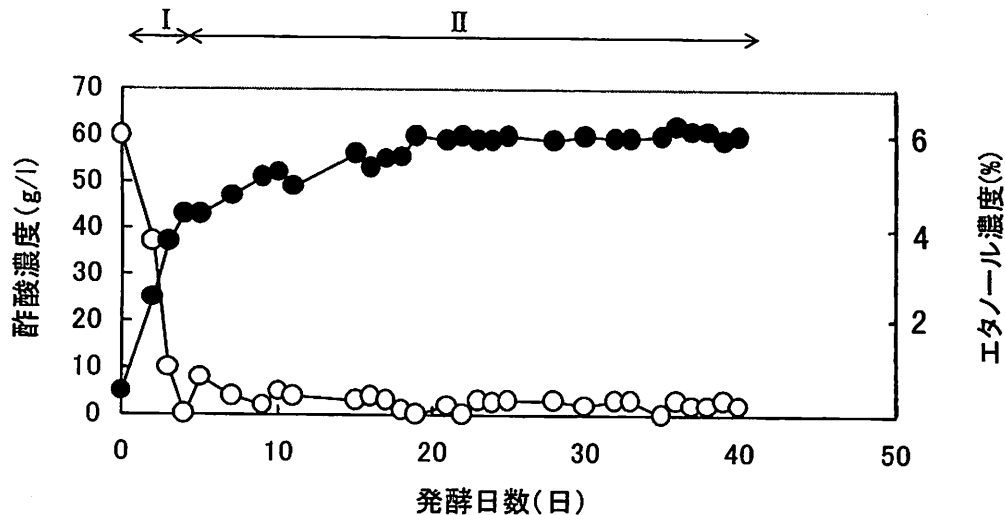


図4.5-2 回転ドラム式リアクターによるカキ酢の連続生産

—○— エタノール —●— 酢酸

注) I ; 静置発酵、II ; 連続発酵

本リアクターの特徴は回転ドラム式にあり、ドラム中に固定化した酢酸菌をドラムの回転により、空気層と液層に交互に接触させることにより空気中の酸素を直接利用し、原料酒中のエタノールを酢酸に変換するものである。このような空気中の酸素を直接利用する方式により、液中への多量の無菌空気の吹き込みを必要とする従来のバイオリアクターでは困難であった発泡性を有するカキ酒を原料とするカキ酢の長期間の安定的連続生産が可能になった。

なお、本リアクターで得られるカキ酢は、原料カキ酒のワイン風味を残したさわやかなものであった。

4.5.4項 小 括

シリコンラバー担体を組み込んだ横型の隔室回転ドラム式バイオリアクターを用いて、空気中の酸素を直接摂取させる方式のバイオリアクターによるカキ酢の連続発酵を行った。カキ酒を連続的に供給することにより、40日間にわたり安定してカキ酢の生産ができた。

連続発酵が定常状態に到達し、酢酸濃度60g/lのカキ酢が生産されるときリアクターの総容積当りの酢酸生成速度は0.33g/l・hであった。

第5章 麹菌を用いたバイオリアクターによる酸性調味料素材の生産

バイオリアクターによる麹菌を利用した調味料生産の研究は、醤油や味噌の製造を目的に麹菌体中の酵素を利用した大豆や小麦等の蛋白質の分解に関するものがほとんどであり、増殖が可能な麹菌を利用したものは少ない。これは、蛋白質の分解には多種類の酵素が必要であるため、多種類の複合酵素を含む麹菌体の利用は都合がよい（山内 1992a）が、麹菌は好気性であるため固定化深部では増殖しにくく固定化に向かないからである（山内 1992b）。

一方、クエン酸は糸状菌や酵母によって発酵生産されるが、その多くは精製した後、酸味料として用いられている。クエン酸の発酵過程においてはシュウ酸が副生産しやすいことや、シュウ酸の生成を抑制するため、あるいはクエン酸の生成を促進するためにメタノールやモノフルオロ酢酸といった化学物質を添加することから、クエン酸発酵液をそのまま醸造食品として利用している例は見あたらない。

そこで、キウイフルーツやカキ等の果実の新たな加工利用を図るため、果汁を原料に増殖が可能な麹菌を利用するバイオリアクターを用いてクエン酸発酵を行い、生産される発酵液をそのまま酸性調味料の素材として利用する醸造食品の開発を試みた。

5.1節 クエン酸生産能力の高い菌株の選定

5.1.1項 序 文

キウイフルーツやカキの果汁を原料にバイオリアクターを用いてクエン酸発酵を行い、生産される発酵液を酸性調味料素材とするために、高いクエン酸生産能力を持つとともに、発酵液の香気に優れ、シュウ酸の副生産もなく、バイオリアクターとして必要な通気攪拌発酵に適したクエン酸発酵菌株の選定を行った。

5.1.2項 実験方法

供試菌株は表5.1-1に示すように、多くは醸造食品製造に利用されている株を供試し、試験には斜面合成培地で30℃、1週間培養した胞子を用いた。

合成培地は スクロース 140g、 NH_4NO_3 2g、 KH_2PO_4 2g、 MgSO_4 250mg、 FeSO_4 20mg、 MnSO_4 14mg (pH3.0) の組成のものを1000mlの脱イオン水に溶かして用いた。果汁は（株）ふくれんから提供されたカキ果汁とキウイフルーツ果汁及び当研究室で搾汁したナシ果汁をそれぞれBrix14になるように脱イオン水で希釈したものをを用いた。

発酵液中の酸は0.1N-NaOHで滴定し、クエン酸として換算した。また、有機酸組成は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。

高速液体クロマトグラフ：島津製作所（株）製LC-6A、カラム：島津製作所（株）製SCR-101H（30cmL×7.9mmID）、カラム温度：40℃、移動相：過塩素酸で調整した水（pH 2.1）、流速：0.8ml/min、検出波長：210nm、注入量：5 μ l

振とう培養は、300ml容三角フラスコにエタノール2%の添加の有無別に合成培地50mlを入れ、麹菌では胞子を、酵母では菌体をそれぞれ1白金耳量摂取し、30℃、90往復/minで21日間往復振とうを行った。また、300ml容三角フラスコにエタノール濃度2%を含有するカキ果汁、ナシ果汁及びキウイフルーツ果汁を50ml入れ、それぞれ 5.7×10^7 個/mlの胞子懸濁液1mlを接種し、同様に14日間往復振とうを行った。

通気攪拌発酵は、2000ml容通気攪拌式ジャーファーマンター（サクラ精機製TBR-2、190mmL×110mmID）にエタノール濃度2%を含有する合成培地1000mlを入れ、0.05% Tween 80で懸濁した 5.7×10^7 個/mlの孢子懸濁液10mlを接種し、培養温度30℃、攪拌回転数300rpm、通気量500ml/minで12日間培養を行った。

表 5.1-1 合成培地における培養21日目のクエン酸濃度とシュウ酸の生成

菌 株	IFO No.	クエン酸濃度 (g/l)		シュウ酸 の生成
		EtOH無添加	EtOH添加	
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	IFO 1658	4.6	4.6	
<i>Aspergillus niger</i>	IFO 4414	5.8	8.1	
<i>Aspergillus niger</i>	IFO 4415	7.4	18.2	+
<i>Aspergillus niger</i>	IFO 4416	12.9	18.1	+
<i>Aspergillus niger</i>	IFO 4417	6.6	2.4	
<i>Aspergillus niger</i>	IAM 31125	10.5	12.8	+
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>fermentarius</i>	IFO 4068	6.9	5.8	
<i>Aspergillus niger</i> mut. <i>schiemanni</i>	IFO 4091	6.3	12.4	
<i>Aspergillus niger</i> mut. <i>cinnamomeus</i>	IFO 6086	2.4	9.5	
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>minimus</i>	IFO 4115	1.8	2.4	
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>piceus</i>	IFO 4116	2.6	5.3	
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>fuscus</i>	IFO 4119	5.8	15.0	+
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>fumenus</i>	IFO 4122	3.1	21.6	
<i>Aspergillus awamori</i>	IFO 4125	1.7	2.5	
<i>Aspergillus awamori</i>	IFO 4314	2.8	3.1	
<i>Aspergillus kawachii</i>	IFO 4308	6.5	22.7	
<i>Aspergillus usamii</i> mut. <i>shiro-usamii</i>	IFO 6082	16.3	16.3	
<i>Aspergillus usamii</i>	IFO 8875	15.9	24.0	
<i>Rhizopus delemar</i>	IFO 4771	5.4	1.9	
<i>Rhizopus delemar</i>	IFO 4801	2.6	1.8	

注) EtOHはエタノール、添加濃度は2%。

5.1.3項 結果及び考察

20種の菌株と合成培地を用いて、エタノール添加の有無別に振とう培養を行ったときの結果を表5.1-1に示す。エタノールを添加していない培地ではIFO 6082が、エタノールを添加した培地ではIFO 4122、4308、6082及び8875が、シュウ酸を副生産することなく良好にクエン酸を生産した。また、これら4菌株はすべて古くから発酵食品の製造に用いられている麹菌であり、培養初期の発酵液の香気は、官能的に好ましいものであった。

これら4菌株を用いて、果汁を培地として振とう培養を行ったところ、ナシとキウイフルーツでは菌体が増殖するのみでクエン酸の生成は認められなかったが、カキでは4菌株とも良好にクエン酸を生産した。カキ果汁を用いた振とう培養14日後の有機酸組成を表5.1-2に示す。これら4菌株の中でシュウ酸を副生産することなく最も多くのクエン酸を生産した菌株はIFO 6082であった。クエン酸はTCAサイクルにおける中間代謝産物であるため、培地中の不純物、過剰の無機塩類の存在、培地の緩衝性がクエン酸の蓄積阻害や他の有機酸を副生産する要因となることが知られている (MOYER 1953、JERNEJCら 1991、1982、PUROHITら 1986、SHUら 1947、宇佐美ら 1977)。果汁を培地にする場合には、これら要因によってシュウ酸の副生産が起こったものと思われる。

また、これら4菌株と合成培地を用いてジャーファーマンターによる通気攪拌発酵を行った結果を表5.1-3に示す。いずれの菌株でもシュウ酸の副生産は認められなかった。クエン酸生産はIFO 6082が最も優れ、振とう培養により生産される濃度を上回っていた。

麹菌は攪拌等の機械的作用による菌糸の損傷、切断を受けると、クエン酸以外の有機酸、特にシュウ酸を副生産したり、クエン酸の生産性が低下することが知られている (宇佐美ら 1985)。しかしながら、麹菌株IFO 6082は攪拌やカキ果汁を培地に発酵を行ってもシュウ酸を副生産することなく、良好にクエン酸を蓄積した。これらのことから、クエン酸発酵調味料を製造するための菌株として*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082が適していると考えられた。

表5.1-2 カキ果汁における振とう培養14日後
の有機酸組成

菌 株	シュウ酸 (g/l)	クエン酸 (g/l)	リンゴ酸 (g/l)	総酸 (g/l)
IFO 4122	N.D.	14.6	0.9	15.5
IFO 4308	1.1	21.9	1.6	24.8
IFO 6082	N.D.	19.5	3.0	22.5
IFO 8875	0.5	13.8	0.8	15.1

注) 1.N.D.は検出されず。

2.発酵開始時のカキ果汁の有機酸組成は

クエン酸4.3g/l、リンゴ酸4.7g/l、総酸9.0g/l。

表5.1-3 合成培地における
通気攪拌培養12日後の生
成クエン酸濃度

菌 株	クエン酸 (g/l)
IFO 4122	16.4
IFO 4308	8.6
IFO 6082	35.6
IFO 8875	22.3

5.1.4項 小 括

合成培地やカキ果汁を用いた振とう培養において、シュウ酸を副生産することなくクエン酸を多く生産する菌株は、麹菌IFO 6082であった。この麹菌IFO 6082は、合成培地を用いたジャーファーマンターによる通気攪拌発酵においても、シュウ酸を副生産することなくクエン酸を最も多く生産した。これらのことから、クエン酸発酵調味料素材の製造に用いる菌株として、*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082を選定した。

5.2節 油脂類の添加によるクエン酸生産性の向上

5.2.1項 序 文

クエン酸生産能力が高く、シュウ酸の副生産が少なく、発酵液の香気に優れ、バイオリアクターとして必要な通気攪拌発酵に適したクエン酸発酵菌株として、麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082を選定した。

一方、TAKAHASHIら（1965）は、界面活性剤の一種であり、食品添加物として認められているソルビタンモノラウレートを増加することによってクエン酸の生産性を向上させることができるとしている。また、FUKUSHIMA(1991)や福島ら（1991、1993）は麹菌によるプロテアーゼ生産の際に培地に醤油油を添加すると、プロテアーゼの生産量と生産活性が向上したと報告している。

そこで、酸性調味料としてさらに高濃度のクエン酸を含む発酵液を効率よく生産するため、界面活性剤や油脂類の添加がクエン酸生成に及ぼす影響を明らかにした。

5.2.2項 実験方法

供試菌株は麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082を用いた。試験には斜面合成培地で30℃、1週間培養した胞子を0.05%濃度の Tween 80で 5.7×10^7 個/mlになるように調整した懸濁液を用いた。培地は5.1.2項で用いた培地にエタノール2%を添加したものに、種々濃度の醤油油、ソルビタンモノラウレート、大豆油、大豆レシチ

ンを添加して、振とう培養や通気攪拌発酵を行った。さらに、(株)ふくれんから提供されたカキ果汁とキウイフルーツ果汁、及び当研究室で搾汁したナシ果汁にエタノール2%と大豆油1%を添加して、通気攪拌発酵を行った。

振とう培養と通気攪拌発酵は5.1.2項と同様に行った。有機酸組成は5.1.2項と同様に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により分析した。

5.2.3項 結果及び考察

合成培地に醤油油、大豆油、大豆レシチンを各濃度添加して14日間振とう培養した結果を表5.2-1に示す。

表5.2-1 合成培地への油脂類の添加がクエン酸生成に及ぼす影響

添加物	添加量 (%)	生成クエン酸濃度 (g/l)
無添加	0	27.8
醤油油	0.2	36.6
	0.5	48.8
	1.0	54.2
	2.0	19.7
	0.2	23.6
大豆油	0.5	36.8
	1.0	38.0
	2.0	39.1
	0.05	40.0
大豆レシチン	0.1	36.1
	0.2	50.5
	0.3	47.3
	0.5	16.7

注) 振とう培養で発酵期間は14日間。

これら3種の添加物はいずれもクエン酸の生成を促進した。クエン酸の生成が最も促進される濃度は、醤油油では0.5~1.0%、大豆油では0.5%以上、大豆レシチンでは0.2~0.3%であった。なお、ソルビタンモノラウレートにクエン酸生成の促進効果は認められなかった。

微生物を培養する際に長鎖脂肪酸、界面活性剤、リン脂質等を添加すると、細胞膜の合成が不完全となり細胞膜の透過性が変化する (SHEU 1972、大亦 1982)。このことから、醤油油、大豆油、大豆レシチンの添加は、麹菌の細胞膜の透過性を増加させたために細胞内に過剰のクエン酸が蓄積することなく、培地中にクエン酸が高濃度に蓄積したものと考えられる。

振とう培養においてクエン酸生成の促進効果が認められた醤油油0.5%、大豆油1.0%、大豆レシチン0.2%をそれぞれ合成培地に添加して、通気攪拌発酵におけるクエン酸生成を検討した。醤油油の1%濃度添加では、調味料としては臭気が強すぎるため、0.5%濃度とした。ジャーファーマンターを用いた通気攪拌発酵の結果を図5.2-1及び図5.2-2に示す。通気攪拌発酵においても振とう培養でクエン酸生成促進効果の認められた油脂類はすべて効果が認められた。最もクエン酸生成を促進したものは大豆油を1%添加した場合で、14日間の発酵で蓄積したクエン酸は、無添加30.1g/lに対して約2.4倍の71.1g/lにも達した。クエン酸生成速度の増強についても大豆油が最も効果が高く、生成速度が最も高まる発酵開始2~6日間の平均生成速度は、無添加0.123g/l・hに対して添加0.369 g/l・hであった。なお、いずれの油脂を添加した場合も、シュウ酸の副生産は認められなかった。

添加物の中で最もクエン酸生成促進効果が高かった大豆油1%をキウイフルーツ果汁、カキ果汁及びナシ果汁に添加し、同様に通気攪拌発酵を行った時の有機酸組成の変化を図5.2-3に示す。大豆油を添加したこの発酵により、キウイフルーツ果汁やナシ果汁を原料にした場合でも、振とう培養では認められなかったクエン酸の生成が認められた。10日間程度の発酵でクエン酸濃度が原料果汁に比べて、キウイフルーツ果汁では約4倍に、カキ果汁では約8倍に、ナシ果汁では約6倍に増加し、それぞれ48g/l、45g/l、30g/lにも到達した。シュウ酸はカキ果汁においてのみ極微量の生成が認められた。これらの発酵液の中でも、キウイフルーツは50g/l濃度以上の総有機酸量を含み、糖がほとんど消失しているため、極めて酸味が強いものであった。好気性である麹菌を深部培養するためには、菌の酸素需要を満足させるために効果的な通気と攪拌操作が必要となる。しかし、農産物を原料とする場合、その多くは発泡性であり、これを防止するためには消泡剤の添加が不可欠となる (清水 1987、山下 1991)。これに対して、醤油油や大豆油を農産物原料果汁に添加すると、通気を行っても発泡が起らず、消泡剤としての役割を果たしていることがわかった。このことは、食品に対して消泡剤等の添加を好まない消費者ニーズと合致していた。

これらの試験の結果から、麹菌 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 を用いてクエン酸を効率的に生産するためには、培地に大豆油を1%添加して、通気攪拌発酵を行えばよいと考えられた。

なお、通気攪拌発酵で得られた発酵果汁の香気は、発酵開始4日目までは原料果実の香りと日本酒様の好ましい麴香を有していたが、それ以降徐々に弱くなり、発酵終了時にはほとんど消失していた。また、発酵液もやや褐変していた。そこで、これらの発酵液に活性炭を加え脱色した後、ろ過し、発酵液3部に対して市販醤油1部の割合で混合し、酸性調味料を得た。これらの酸性調味料の中でもキウイフルーツは糖が少なく、クエン酸を主成分とする高濃度の酸を含有するため、カボスやスダチ等の柑橘系の調味液に似た嗜好性の良いものであった。

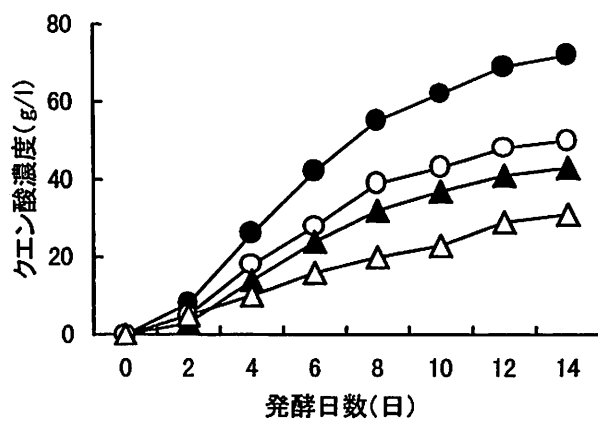


図5.2-1 添加物がクエン酸生成に及ぼす影響

● 大豆油 ○ 醤油油
▲ 大豆レシチン △ 無添加

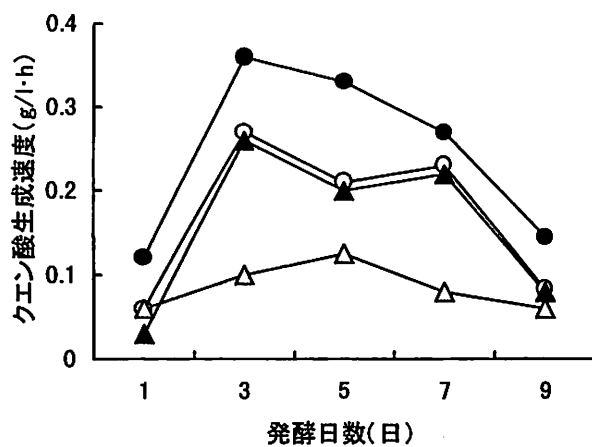


図5.2-2 添加物がクエン酸生成速度に及ぼす影響

● 大豆油 ○ 醤油油
▲ 大豆レシチン △ 無添加

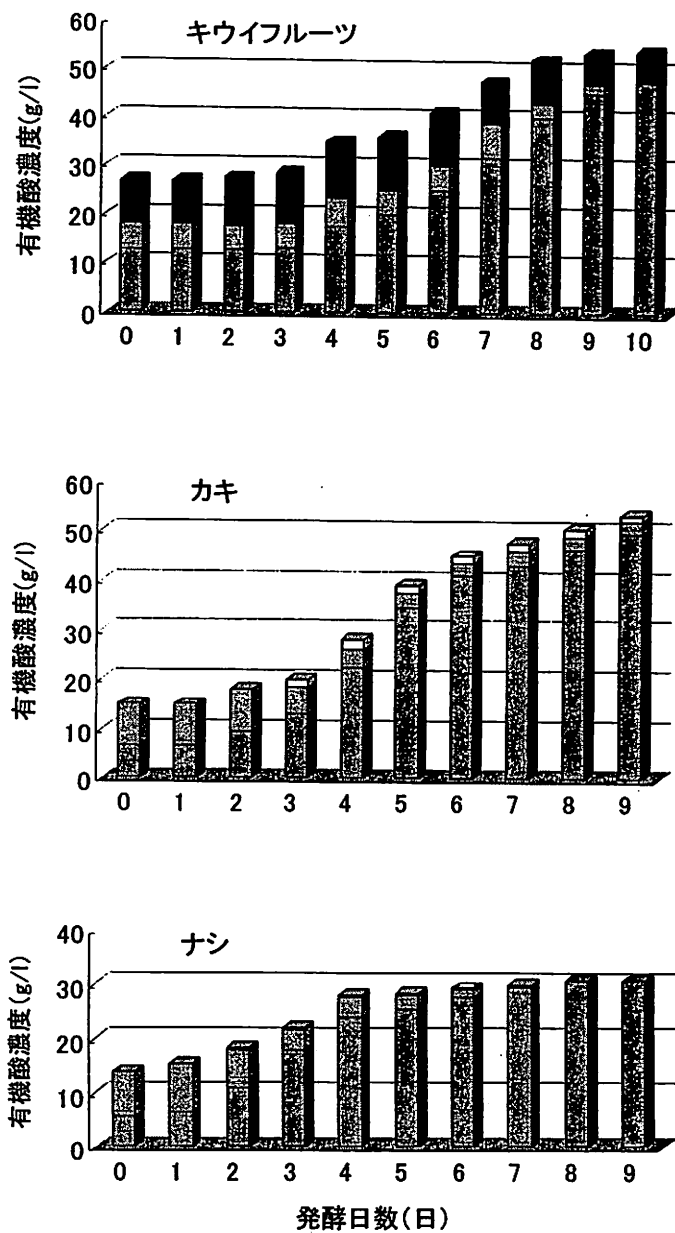


図5.2-3 果汁を用いた通気攪拌発酵における有機酸組成の変化

〇 クエン酸 □ リンゴ酸 □ シュウ酸 ■ キナ酸

5.2.4項 小 括

果汁を原料にした新規の酸性調味料を効率よく発酵生産するために、培地への油脂類の添加が麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082のクエン酸生産に及ぼす影響について検討した。合成培地を用いた振とう培養においてクエン酸の生産を促進した油脂類とその濃度は、醤油油0.2~1.0%、大豆油0.5~2.0%及び大豆レシチン0.2~0.3%であった。発酵液の外観、香気を併せて判断した結果、それぞれの最適添加濃度は醤油油0.5%、大豆油1.0%、大豆レシチン0.2%であった。それぞれの最適添加濃度において通気攪拌発酵を行ったところ、クエン酸の生産を促進する効果は大豆油が最も高く、無添加 30.1 g/lに対して71.1g/lのクエン酸を14日間で生産した。

カキ果汁、キウイフルーツ果汁及びナシ果汁にエタノール2%と大豆油1.0%を添加して通気攪拌発酵を行った結果、10日間程度でクエン酸をそれぞれ 45 g/l、48g/l及び30 g/l含む発酵液が得られた。これらの発酵液と醤油を混合したものは、果汁ベースの新しいタイプの酸性調味料として有望と考えられた。

5.3節 麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082によるクエン酸の連続生産

5.3.1項 序 文

これまで、みりんや焼酎等の食品製造用の菌株として高い評価を受けている麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 (大屋敷 1989) が、高濃度のクエン酸を生産蓄積すること、またこの菌株を用いて培地に大豆油1%を添加し、遊離菌体を用いた通気攪拌による回分発酵を行うことによりクエン酸の生産が飛躍的に高まることを明らかにした。この結果を基に、さらにクエン酸の効率的な生産を図るために、種々の担体に麹菌を固定化したバイオリクターによる連続発酵を試みたが、培養中に菌糸と担体が絡み合って大きな固まりとなり、生成クエン酸濃度が低下するとともに攪拌操作や通気に支障をきたし、発酵を中止せざるを得なかった。

そこで、遊離菌体を用いた通気攪拌による連続発酵条件について検討した。

5.3.2項 実験方法

供試菌株は麹菌*Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082を用いた。合成培地は5.1.2項と同じものに、エタノール2%と大豆油1%を添加して用いた。孢子懸濁液は、斜面合成培地で30℃、1週間培養した孢子を0.05%濃度のTween 80で 5.7×10^7 個/mlになるように調整し、この懸濁液10mlを合成培地1000mlに対して使用した。菌糸培養液は、500ml容三角フラスコに100mlの合成培地を入れ、孢子懸濁液10mlを接種して、30℃で48時間振とう培養を行って得た。

通気攪拌発酵は5.1.2項と同じジャーファーマンターを使用し、合成培地に孢子懸濁液または菌糸培養液を添加し、培養温度30℃、回転数300rpm、通気量1000ml/minで行った。連続発酵はジャーファーマンターにエアコンプレッサー、送液ポンプ及び電磁弁等を取り付け、通気攪拌を行いながらタイマーにより電磁弁を定期的に作動させることにより、自動的に培地交換を行う方式とした。

このうち単槽式連続発酵では、ジャーファーマンターに入れた1000mlの合成培地に孢子懸濁液添加後、一定期間発酵を行いクエン酸が25~30g/lに達した後、菌体を含まな

い発酵ろ液だけを排出する操作、または菌体を含む発酵液を排出する操作をそれぞれ行い、新鮮合成培地のみまたは菌糸培養液と新鮮合成培地の両方を供給することにより一定量で連続的に発酵を行った。発酵ろ液に対する新鮮合成培地の交換操作は、1.5時間毎に10ml/回の割合で行った。また菌体を含む発酵液に対する菌糸培養液と新鮮合成培地の両方の交換操作は、1日毎に160ml/回の割合で行いながら菌糸培養液16ml及び新鮮培地144mlを添加する操作、あるいは3時間毎に20ml/回の割合で行いながら同量の新鮮合成培地を供給し、孢子懸濁液1.6mlを1日1回添加する操作を行った。

また、2槽式連続発酵では、図5.3-1に示すように電磁弁を付けたシリコンチューブでジャーファーマンターを2槽連結し、合成培地を第1槽には500、750及び1000ml、第2槽にはすべて1000ml入れ、それぞれの槽の合成培地量に対応する孢子懸濁液を添加し、培養を行った。一定期間培養後、1.5時間毎に15ml/回の割合で菌体を含む発酵液を第1槽から第2槽に供給し、同時に第2槽から同量の菌体を含む発酵液を排出させた後、同量の新鮮培地を第1槽に供給する連続発酵を行った。連続発酵開始から毎日1回、第1槽に孢子懸濁液10mlを添加した。クエン酸は5.1.2項の有機酸分析と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。

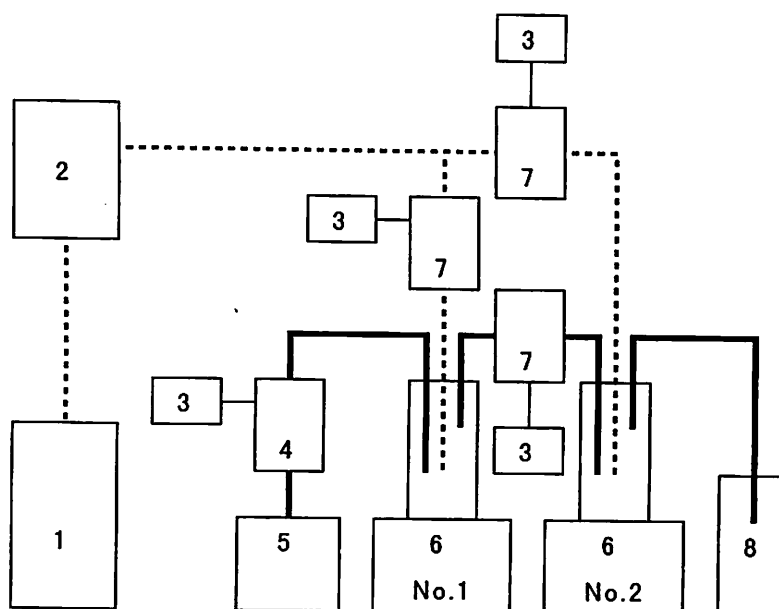


図5.3-1 2槽式連続発酵の概略

- 1: コンプレッサー、2: エアーフィルター、3: タイマー、4: 送液ポンプ、
5: 培地、6: ジャーファーマンター、7: 電磁弁、8: クエン酸発酵液

5.3.3項 結果及び考察

一般的にクエン酸の生産速度（ V ）は次式で表される（桜井 1991、吉田 1985）。

$$V = \alpha \cdot v + \beta \cdot x$$

α : 比例定数（無次元）

v : 菌の増殖速度（g-cell/l・h）

β : 生産菌当たりの活性（g/h・g-cell）

x : リアクター槽容積当たりの菌数（g-cell/l）

したがって、連続発酵においてリアクターの単位容積当たり生産速度を維持向上させるためには、増殖活性や生産活性の高い菌体が発酵液とともに流出しないようにする操作や、活性の衰えた菌体を速やかに活性の高い菌体と交換する操作が必要であると考えられる。図5.3-2にリアクター内の菌数を維持もしくは増加させるために種々の操作を行い、連続発酵を行ったときに生産された発酵液中のクエン酸濃度の変化を示す。菌体を含む発酵液を排出させ新鮮合成培地だけを添加しただけのもの（④）では、連続発酵開始2日目ごろからクエン酸濃度が低下したが、菌体を含まない発酵液だけを排出させ孢子懸濁液を添加する操作（②）、および菌体を含む発酵液を排出させ菌糸培養液を添加する操作（①）を行ったリアクターでは、高濃度の菌数や活性の高い菌が確保されたため、いずれも連続発酵開始後にクエン酸濃度が大幅に増加し、それぞれ42及び45g/lの濃度に到達した。しかし、その後急速にクエン酸濃度が低下し始め、目標とする30g/l以上のクエン酸濃度を長期に維持することはできなかった。この急速な濃度の低下は、高濃度に蓄積したクエン酸により培地のpHが低下し、菌のクエン酸生産活性や増殖活性が不可逆的に影響を受けたと思われる。また、菌体を含む発酵液を流出させ新鮮合成培地だけを添加する方式（④）に比べて、孢子を添加する方式（③）がほとんどクエン酸濃度に差がないことは、添加された孢子が高濃度クエン酸あるいは低pH条件下において本来の生産活性を持つ菌糸に生育していないと考えられる。

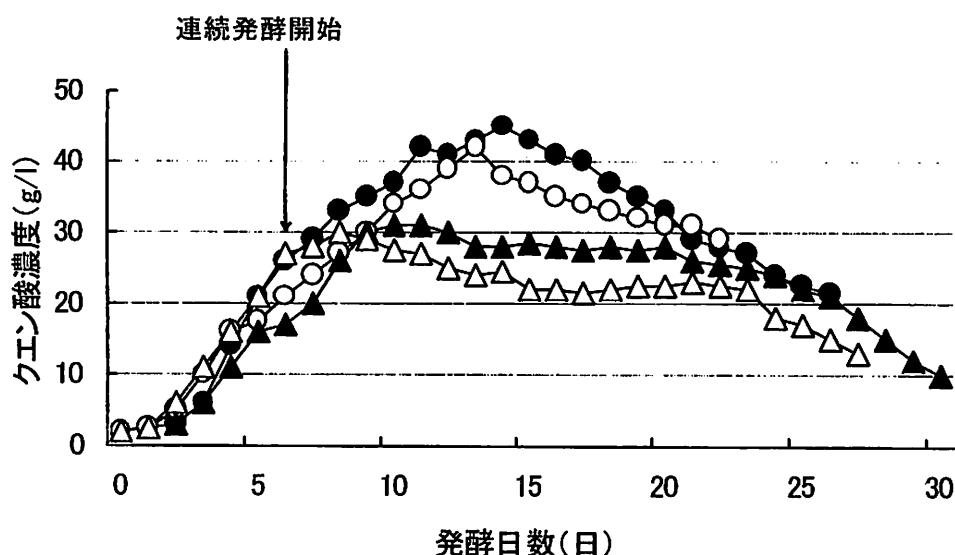


図5.3-2 菌糸や孢子の添加による単槽式連続発酵

- ①菌体を含む発酵液の排出 + 菌糸培養液添加
- ②菌体を含まない発酵液の排出 + 孢子懸濁液添加
- ▲ ③菌体を含む発酵液の排出 + 孢子懸濁液添加
- △ ④菌体を含む発酵液の排出

これらのことから、より高濃度のクエン酸発酵液を長期に生産するためには、増殖活性や生産活性の高い菌系が常に発酵槽に供給されるとともに、発酵槽のクエン酸生成速度に応じた希釈率で連続発酵が行われる必要があり、宇佐美ら（1977）が提案しているような菌生育と酸蓄積を分割させる発酵方式が有効と考えられた。

そこで、リアクターを2槽連結することにより、低クエン酸濃度に維持した第1槽で孢子から菌系に生育させることにより活性菌体の増殖を行い、適切な希釈率で第2槽に経時的に活性菌体を送り込むことによって第2槽で本格的なクエン酸生産を行う方式を検討した。リアクターの第1槽を500、750及び1000mlとして、第2槽をすべて1000mlに設定し、連続発酵を行ったときのクエン酸濃度の変化を図5.3-3に示す。第1槽が500mlのも

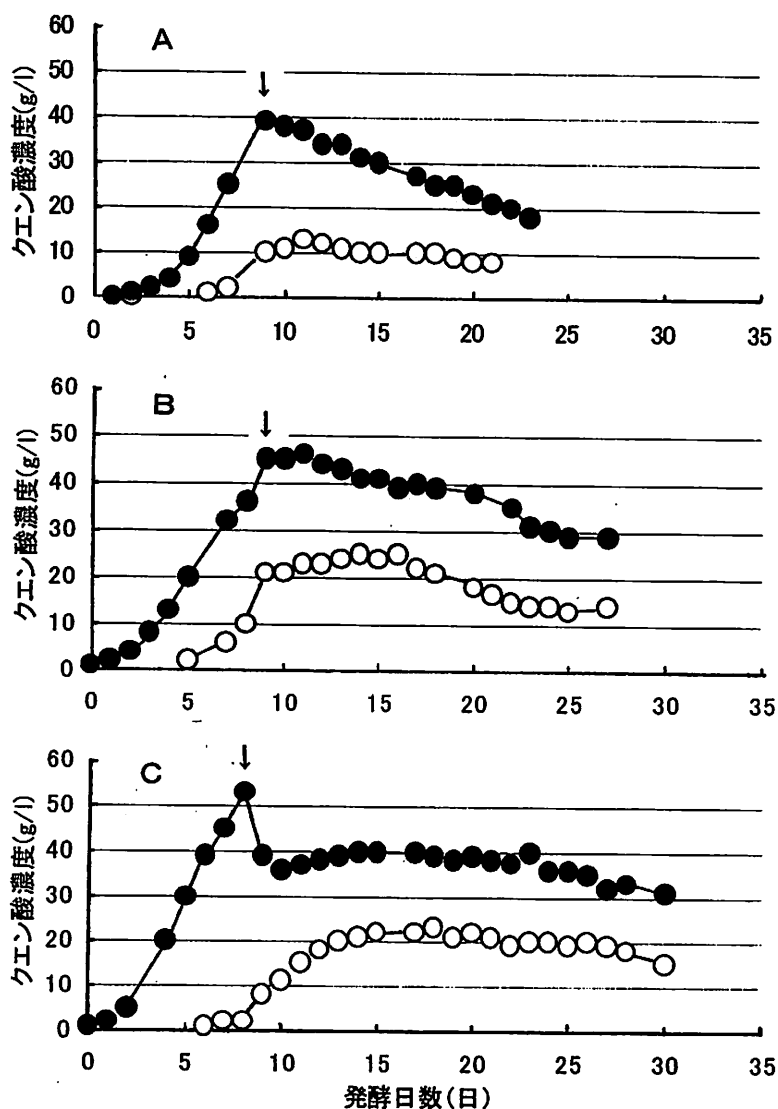


図5.3-3 第1槽の容量が異なる2槽式連続発酵

A : ○; 第1槽- 500ml、●; 第2槽-1000ml
 B : ○; 第1槽- 750ml、●; 第2槽-1000ml
 C : ○; 第1槽-1000ml、●; 第2槽-1000ml

注) ↓は連続発酵開始

のは発酵開始後、クエン酸濃度が徐々に低下したが、第1槽が1000mlのものでは発酵開始後22日間もの長い期間、クエン酸濃度30g/l以上の発酵液を連続的に生産することができた。このことは、5.2.3項で報告したようにクエン酸生成速度のピークは孢子培養後2～6日目に現れることから、培養2日後には第1槽の発酵液の約73%が交換される第1槽500mlのものでは、希釈率が高すぎるために添加した孢子がクエン酸生産活性の高い菌系に十分生育する前に第2槽に送り込まれ、蓄積している高濃度のクエン酸や低pHの環境条件により十分なクエン酸生成が行えなかったものと思われる。

クエン酸生成速度が高かった第2槽-1000mlのリアクターにおける連続発酵開始3日目以降の生成速度を図5.3-4に示す。クエン酸濃度が30g/l以上の発酵液を生産するときの平均の生成速度は、0.17g/l・hであった。これらの値は既報のDual Hollow-Fiber型 (CHUNG 1988)、Airlift型 (VALJA 1982) 及び Tower型 (HORITU 1985) のバイオリアクターと比較すると、生成速度ではDual Hollow-Fiber型やAirlift型には劣ったものの、生成濃度はいずれにも勝り、酸性調味料の製造に望ましい30g/l以上のクエン酸濃度を22日間に渡って確保できた。しかし、この2槽式においても、クエン酸濃度30g/l以上の発酵液を生産するときの生成速度は徐々に低下しており、生成速度のより長期安定性を図るためには、さらに改善を行う必要がある。

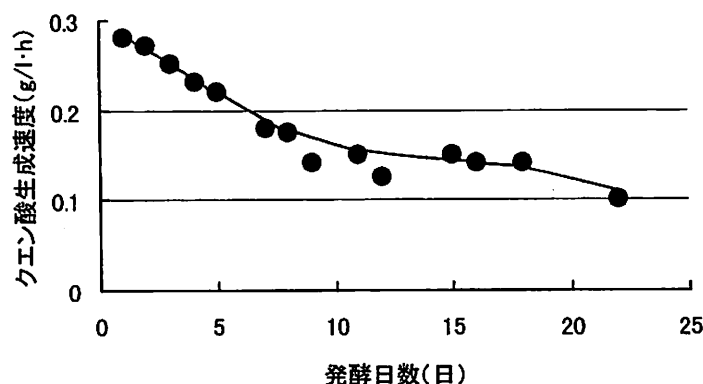


図5.3-4 第1槽;1000ml、第2槽;1000mlの2槽式連続発酵におけるクエン酸生成速度

5.3.4項 小 括

麹菌 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082の遊離菌体を用いた通気攪拌発酵により、クエン酸の連続生産を行った。

単槽式連続発酵において、菌体を含まない発酵ろ液だけを流出させながら孢子懸濁液を添加する操作、または菌体を含む発酵液を流出させながら菌糸培養液を添加する操作を行ったリアクターは、最高クエン酸濃度がそれぞれ42、45g/lに達したが、その後、急速にクエン酸濃度が低下した。

単槽式を改良した2槽式連続発酵において、第1槽を1000ml、第2槽を1000mlとし、連続発酵開始から毎日1回、第1槽に孢子懸濁液10ml (5.7×10^8 個)を添加することにより、希釈率 $0.005h^{-1}$ で連続発酵開始後22日間に渡り、平均 $0.17 g/l \cdot h$ のクエン酸生成速度でクエン酸濃度30g/l以上の発酵液を生産することができた。

第6章 グルコースオキシダーゼを用いた農産物搾汁液からの グルコン酸生産

健康志向の高まりを背景に、野菜飲料の消費が増加している。しかし、ニンジン等の野菜飲料は酸味が乏しいために、製品化の段階で酸味付けのためにレモン果汁等の添加を行わざるを得ない。酸味の乏しい原料だけで適度な酸味を有する飲料にするには、微生物による乳酸発酵や酢酸発酵によらなければならないが、微生物を用いた発酵法では原料素材の風味が大きく変化してしまうという欠点がある。

一方、貴腐ワインやローヤルゼリーに多く含まれるグルコン酸は、まろやかで爽快感と腸内ビフィズス菌増殖活性を有する（ASANOら 1993、浅野ら 1993）とされており、食品に添加されるなど広く利用されている。

グルコン酸の生成には、グルコースオキシダーゼを用いる酵素法と微生物を用いる発酵法があるが、現在、グルコン酸の生産は澱粉を原料に発酵法により行われている。これは、酵素法では反応効率が悪く、経済的に割高になる理由からであり、食品加工の分野においてグルコースオキシダーゼは、食品中の溶存酸素や微量のグルコース除去、およびバイオセンサー等にしか利用されていない。

そこで、グルコースオキシダーゼを用いる酵素法で効率的にグルコン酸を生成させるための条件を検討し、この条件をニンジンやキウイフルーツ等の搾汁液に適用することにより、酸味の乏しい原料素材だけで酸味を有する飲料や、酸性調味料素材等への利用について研究した。

6.1節 農産物搾汁液を原料にした回転振とう処理によるグルコン酸生成

6.1.1項 序 文

グルコン酸の生成には、グルコースオキシダーゼ（以下、GOD）を用いる酵素法と微生物を用いる発酵法があるが、飲料や酸性調味料素材等を製造するために農産物搾汁液を原料に用いた場合、発酵法では原料素材の風味が大きく変化してしまうという欠点がある。

一方、酵素法で用いるGOD（*Aspergillus niger*起源）は、至適pHは5.5付近、温度は35℃付近が最も活性が高く、pHは5.0～7.0の範囲、温度は55℃以下で安定である（山下 1998）。農産物搾汁液の中でも、野菜搾汁液は果汁に比べて一般的にpHが高く、pH5.0～7.0の範囲にあるものが多いためグルコースオキシダーゼの利用には適しており、グルコン酸の酸味を有する新しい飲料が誕生することも予想される。さらに、キウイフルーツ等の果汁はクエン酸等の有機酸を多く含んでいるが、GODによりグルコースをグルコン酸に変換できればさらに酸味が強くなり、酸性調味料素材への適用も考えられる。

そこで、プラスコレベルで農産物搾汁液にGODを用いることにより、原料風味豊かな新規飲料や調味料素材の製造の可能性を検討した。

6.1.2項 実験方法

供試原料は、表6.1-1に示す糖と有機酸組成のものを加熱し、種々の酵素活性を失活させて用いた。濃縮ニンジン汁は（株）ふくれん加工工場で搾汁し減圧濃縮した業務用

搾汁液を、また、エチレン追熟を行ったキウイフルーツやナシはペクチナーゼ処理しセライトろ過した果汁を、サトウキビは粗搾汁液をセライトでろ過したものを用了。

供試酵素のGODは、カタラーゼ（以下、CAT）が混合されている食品添加用粗酵素粉末（天野製薬（株）製、*Aspergillus niger*起源）を用了した。

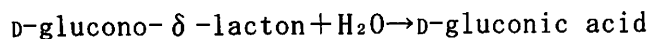
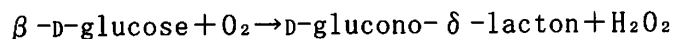
酵素反応のための反応槽はヒダ付き300ml容三角フラスコを用了し、粗酵素剤を0.05g（75 U）添加し、搾汁液50ml規模で150rpmの回転振とうを行った。ただし、酵素単位は40℃、pH7.0の条件下で1分間に1μmolのグルコースを酸化し、グルコン酸を生成する酵素量を1 Uと定義したカタログ記載の値から換算した。グルコン酸等の有機酸は5.1.2項と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。糖は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。

高速液体クロマトグラフ：島津製作所（株）製LC-6A、カラム：島津製作所（株）製CLC-NH₂(M)（15cmL×7.9mmID）、カラム温度：30℃、移動相：アセトニトリル・75：水・25、流速：1.0ml/min、示差屈折計検出、注入量：5μl

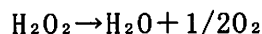
6.1.3項 結果及び考察

GODとCATが触媒する反応は次のとおりである。

GOD



CAT



ヒダ付き三角フラスコに種々の農産物搾汁液を入れ、回転振とうを24時間行ったときのグルコン酸生成量やpH、糖組成の変化を表6.1-1に示す。反応24時間後には濃縮ニンジン汁では77g/lものグルコン酸が生成している。キウイフルーツ果汁、ナシ果汁、サトウキビ汁では26~40g/l程度しか生成していないことは、濃縮ニンジン汁以外は反応後のpHが3.3以下まで低下していることから、酵素活性の低下と失活が起こり、これ以上の反応は進行しなかったためと思われる。また、糖ではグルコン酸と同様に腸内ビフィズス菌の増殖活性を有するフラクトオリゴ糖（日高ら 1987）のひとつであるkestoseが濃縮ニンジン汁とサトウキビ汁で生成している。

さらに、GODの基質であるグルコースが原料中には存在していないサトウキビ汁においてもグルコン酸が生成し、スクロースの減少とフラクトース及びグルコースの生成が認められる。これらの現象は、スクロースを基質にフラクトオリゴ糖を生成するβ-フラクトフラノシダーゼ（日高ら 1985）が用了した粗酵素剤に混在しているためと思われる。このようにグルコン酸の生成とフラクトオリゴ糖の生成が同時に進行する現象は、*Aspergillus niger* IAM 2094等の微生物菌体を粗酵素剤として用了したときにも認められる（藤井ら 1999）。

これらの酵素反応により得られた農産物搾汁液は、グルコン酸の酸味と原料本来の風味を有しており、新しい農産物天然飲料や酸性調味料素材等の開発が十分可能であると思われる。

表 6.1-1 酵素処理24時間後の成分変化

作 物	糖、有機酸 及び pH	反 応 時 間 (hr)	
		0	24
濃縮ニンジン汁	フラクトース	71.6	72.0
	グルコース	93.7	63.3
	スクロース	163.4	99.5
	kestose	tr	46.7
	グルコン酸	0	76.8
	リンゴ酸	24.0	24.0
	pH	5.9	3.8
キウイフルーツ	フラクトース	47.3	46.6
	グルコース	49.1	26.5
	グルコン酸	0	29.3
	クエン酸	12.7	11.7
	リンゴ酸	5.3	5.6
	キナ酸	8.3	8.7
	pH	3.6	3.3
ナシ	フラクトース	63.8	64.4
	グルコース	46.1	23.3
	グルコン酸	0	40.0
	クエン酸	1.1	1.1
	リンゴ酸	6.8	8.9
	pH	4.8	3.3
サトウキビ	フラクトース	0.8	15.7
	グルコース	tr	12.7
	スクロース	208.0	123.6
	kestose	0	38.4
	グルコン酸	0	26.0
	アコニット酸	2.2	2.1
	pH	5.3	3.0

注) 糖と有機酸濃度の単位は g/l。

6.1.4項 小 括

ヒダ付き三角フラスコに種々の搾汁液を入れ、回転振とうを24時間行った結果、反応24時間後には濃縮ニンジン汁、キウイフルーツ果汁、ナシ果汁及びサトウキビ汁でそれぞれ77、29、40及び26g/lものグルコン酸が生成した。

さらに、GODの基質であるグルコースが原料中には存在していないサトウキビ汁においてもグルコン酸が生成し、スクロースの減少とフラクトース及びグルコースの生成が認められた。これらの酵素反応により得られた農産物搾汁液は、グルコン酸の酸味と原料本来の風味を有していた。

6.2節 ジャーファーマンターを用いたグルコン酸生成に及ぼす酵素量と加圧の影響

6.2.1項 序 文

グルコン酸の生成には、グルコースオキシダーゼ（以下、GOD）による酵素法と微生物による発酵法があるが、現在、工業的には発酵法が用いられている。これは、グルコースオキシダーゼ（*Aspergillus niger*起源）の溶存酸素に対する K_m は38℃において0.83mM（26.6ppm）とされている（GIBSON 1964）が、酵素反応の最適温度35℃付近における空気の飽和溶存酸素濃度は約7ppmであるため、酵素法では反応に空気を用いる場合、溶存酸素の供給が律速になり十分な生成速度が得られず、また生成速度を高めるために酸素を通気する場合には酸素の利用効率が低くコスト高になる理由からである。

しかし、酸素ポンプを繋いだ密閉条件下で、さらに溶存酸素の供給を高めるために、加圧条件下で酵素反応を行わせることができれば、酸素の利用効率が100%に近い状態でグルコン酸生成速度の大幅な向上が期待できる。

そこで、遊離酵素を用いたグルコン酸生成に及ぼす酵素量と加圧の影響を明らかにした。

6.2.2項 実験方法

原料として、グルコン酸生産試験に供試したグルコース溶液には100g/l濃度のD-グルコース（和光純薬工業（株）製）を含むMcIlvaine緩衝液（pH6.0）を、濃縮ニンジン汁及びキウイフルーツ果汁は6.1.2項と同じものを用いた。

供試酵素のGODとCATは、6.2.1項と同じものを使用し、粗酵素粉末15gを純水45mlで溶解した後、3300rpmで10分間遠心分離して得た上清を粗酵素液とした。この粗酵素液1mlの活性は333mgの粗酵素粉末に相当し、1ml当たり2.9mgのタンパク質を含んでいた。

本GOD粗酵素粉末の酵素単位は、カタログでは40℃、pH7.0において1 μ mol/minの速度でグルコン酸を生成する酵素量を1 Uとし、1500 U/gと記載されているが、酸素加圧下で反応させると表記されている酵素単位以上にグルコン酸が生成する。そこで、本研究ではグルコースを含む緩衝液に粗酵素粉末を添加し、酸素加圧2atm、攪拌速度400rpm、液中への酸素通気量1000ml/minという十分な溶存酸素供給の条件下、35℃、pH6.0で1 μ mol/minの速度でグルコン酸を生成する酵素量を1 Uとした。この条件下で、粗酵素粉末のGOD活性は7300 U/gであった。

CATの酵素単位は、25℃、pH7.0において1 μ mol/minの速度で過酸化水素を分解する酵素量を1 Uとした。CATの活性はTANIDA（1996）、PATTERSONら（1984）の方法に基づいて240nmの吸光度の減少から測定する方法により行った。粗酵素粉末のCAT活性は173600 U

/g、その比活性は20000 U/mg-proteinであった。

酵素反応のための反応槽は2000ml容通気攪拌式ジャーフェーマンター（サクラ精機製 TBR-2、190mmL×110mmID）を使用し、1000ml規模で試験を行った。酸素ポンベによりフェーマンターのヘッドスペースを酸素で置換した後、pHと溶存酸素濃度の制御は行わず、酸素加圧下、温度35℃、攪拌速度400rpmで反応させた。供試液にグルコースを含む緩衝液を用いた場合にはヘッドスペースの酸素をエアープンプを用いて液中に1000ml/minで通気を行い、農産物搾汁液の場合には通気は行わなかった。

グルコン酸は5.1.2項の有機酸分析と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量し、遊離グルコン酸とグルコノデルタラクトンの合計で示した。すなわち、試料溶液に2M水酸化カリウム溶液を加えてpH10に調整した後、5分間放置することにより試料溶液中のグルコノデルタラクトンを遊離グルコン酸に変換し（講談社サイエンティフィック編 1992）、直ちにHPLCで分析した。ただし、いずれの試料溶液でもグルコノデルタラクトンの含量は2g/l以下であった。

粗酵素液のタンパク質含量はプロテインアッセイキット（Bio-Rad Laboratories製）を用いて、溶存酸素濃度はフェーマンター液中の溶存酸素を直接、隔膜式ガルバニ電池式酸素計（サクラ精機（株）製N-1）を用いて測定した。過酸化水素の定量は4-アミノアンチピリン法（慶田ら 1981）を用いた。

6.2.3項 結果及び考察

100g/lのグルコースを含む緩衝液を原料として、グルコン酸生成に及ぼす粗酵素液の添加量を総容量1000mlの規模で検討した。図6.2-1に酸素加圧2atm下で反応させたときの反応開始10分後のグルコン酸生成量を示す。通気を行わない場合には、粗酵素液3ml（8.7mg-protein、GOD;7300 U、CAT;173600 U）まで、酸素通気を行った場合には粗酵素液6ml（17.4mg-protein、GOD;14600 U、CAT;347200 U）までは、それぞれ酵素濃度にほぼ比例して生成量が増加しており、これ以上の酵素量では酸素供給が律速になるものと思われる。SAKURAIら（1989）は微生物を固定化した発酵法により溶存酸素濃度とpHを制御した酸素加圧条件下において、60g/l・hものグルコン酸生成速度を達成している。しかし、粗酵素液6mlを使用すると溶存酸素濃度やpHを制御していないにもかかわらず、反応開始10分という短時間で30g以上ものグルコン酸が生成され、計算上その速度は180g/l・hとなることから、グルコン酸の生成反応を短時間に終了させるためには、現行法の微生物による発酵法よりも酵素を利用する方がはるかに有利であると思われる。

濃縮ニンジン汁やキウイフルーツ果汁997mlに粗酵素液3ml（8.7mg-protein、GOD;7300 U、CAT;173600 U）を添加し、溶存酸素の供給効率が高まるように酸素加圧の程度を変え、グルコン酸生成量を追跡した結果を、図6.2-2及び図6.2-3に示す。濃縮ニンジン汁の場合、加圧せずにしかもヘッドスペースが空気の場合、グルコン酸の生成はほとんど認められないが、酸素ポンベを用いて加圧程度を高めるほど、グルコン酸の生成は速やかになり、3atm加圧下では6時間後にグルコン酸濃度は52g/lにも達している。発泡するために通気ができない濃縮ニンジン汁の場合、グルコースを含む緩衝液に比べて生成速度は低いものの、より高圧にできれば生成速度はさらに高まるものと考えられる。空気ではグルコン酸の生成がほとんど認められなかったことは、溶存酸素濃度が0.1ppmで推移していたことから、溶存酸素の供給が低すぎたものと思われる。また、キウイフルーツ果汁の場合、初発pHが低いために濃縮ニンジン汁ほどは、グルコン酸の生成が速やかではないが、反応が停止した3時間後には、3atm加圧下で約24g/lが生成している。佐藤

(1991) はバイオリアクターを酸素加圧状態で稼働させることにより、微生物の増殖を抑制できることを報告している。したがって、反応速度を向上させるために密閉した反応容器の中で酸素加圧下で酵素反応を行わせる方法は、酸素のロスが無いために経済的であるとともに、風味の劣化のために製品化の最終工程以外は加熱滅菌できない農産物搾汁液を原料にする場合、特に微生物対策上、有効である。

なお、これらの酵素反応後の液中には過酸化水素は検出されなかった。

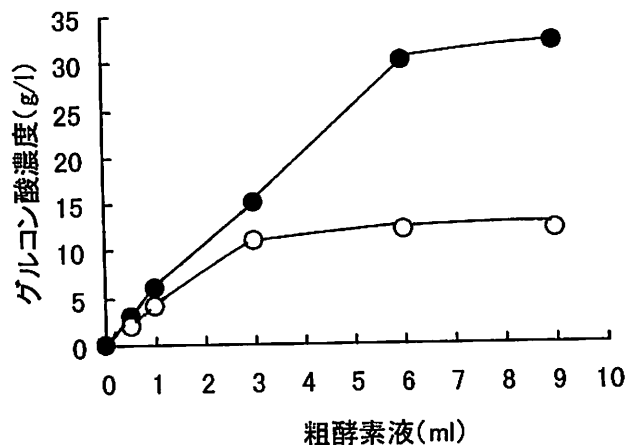


図6.2-1 粗酵素添加量と10分間に生成するグルコン酸の関係

● 酸素通気 ○ 無通気

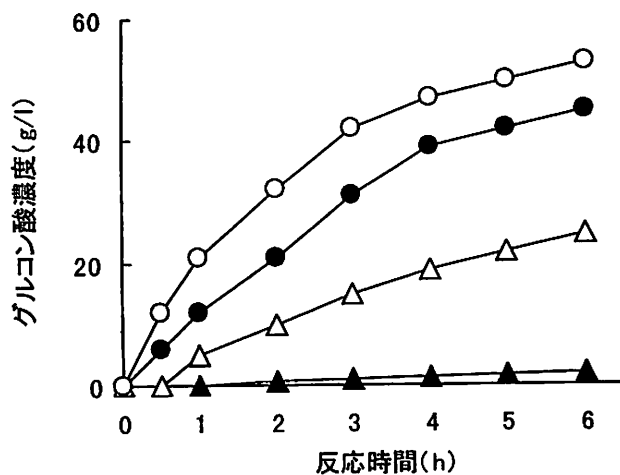


図6.2-2 濃縮ニンジン汁におけるグルコン酸生成に及ぼす酸素加圧の影響

▲ 0atm O₂ △ 0.5atm O₂
● 1atm O₂ ○ 3atm O₂

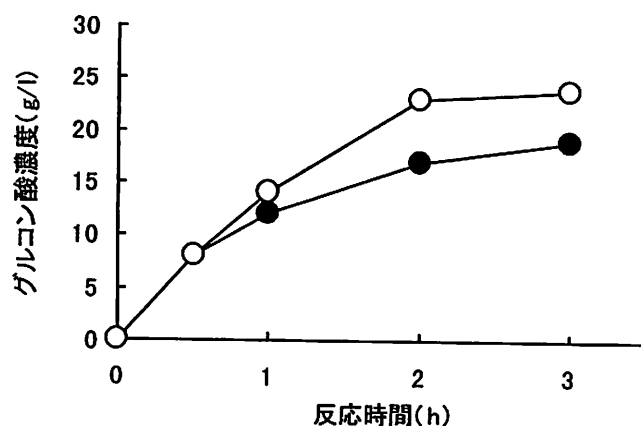


図6.2-3 キウイフルーツ果汁におけるグルコン酸生成に及ぼす酸素加圧の影響

● 1atm O₂ ○ 3atm O₂

6.2.4項 小 括

グルコースオキシダーゼとカタラーゼを酸素加圧密閉条件下で反応させ、グルコン酸生成速度の向上を図るとともに、濃縮ニンジン汁やキウイフルーツ果汁を原料にして、グルコン酸による酸味を有する飲料の製造を行った。

酸素加圧2atm下で17.4mg-protein含量のグルコースオキシダーゼとカタラーゼの粗酵素液をグルコースを含む緩衝液1000mlに反応させると、反応開始10分間のグルコン酸生成量は30gに、その生成速度は180g/l・hに達した。

酸素加圧下での酵素反応では、加圧程度を強めるほど生成速度は向上し、濃縮ニンジン汁では酸素3atm加圧下で6時間後には52g/lの、またキウイフルーツ果汁では反応が停止した3時間後には24g/lのグルコン酸が生成した。

6.3節 固定化酵素によるグルコン酸の連続生産

6.3.1項 序 文

微生物の代わりに遊離の状態で酵素GODを使用することにより、酸味料等の添加物を用いなくて酸味の乏しい原料だけで適度な酸味を有するものにすることができ、消費者ニーズに合致した食品開発の可能性が示唆された。遊離酵素の代わりに固定化酵素を用いて酵素反応を行えば、酵素費用の低コスト化にも繋がるとともに、酵素さえも無添加の食品製造が可能になり、そのメリットは大きいと考えられる。

そこで、緩衝液や濃縮ニンジン汁を原料に固定化酵素を用いた反復回分反応によるグルコン酸の連続生産を行った。

6.3.2項 実験方法

酵素反応には6.2.2項と同じジャーファーメンターを用いた。供試液にグルコースを含む緩衝液を用いた場合はヘッドスペースの酸素をエアポンプを用いて液中に1000ml/minで通気を行い、濃縮ニンジン汁の場合は通気を行わなかった。供試酵素は6.1.2項と同じものを用いた。

固定化担体にはキトパール(富士紡績(株)製、BCW-4010)を使用し、MATSUMOTOら(1988)がバイオセンサー構築のためにGODを固定化した方法により、GODとCATの粗酵素を一緒に固定化した。固定化酵素はナイロン製メッシュ袋に入れ、ファーメンター内に装着し、酸素加圧2atmで4時間の回分反応を繰り返して行った。その他の分析方法等はすべて6.2.2項と同じ条件で行った。

6.3.3項 結果及び考察

グルコースを含む緩衝液及び濃縮ニンジン汁に固定化酵素27g-wet support(GOD; 700 U、CAT; 2620 U)を用いて回分反応を繰り返して行ったときの結果を、図6.3-1に示す。濃縮ニンジン汁では、緩衝液に比べて約50%の生成速度が得られたのみであった。また、両原料ともに繰り返し回数が増える度に徐々に生成速度が低下し、緩衝液では6回以上、濃縮ニンジン汁では4回以上反応を繰り返すと反応開始時の半分以下の生成速度になった。これらの生成速度の低下の度合いは、生成したグルコン酸による原料液のpH低下による酵素の失活程度よりも大きい。このことは、使用した固定化担体が多孔質であるため生成したグルコン酸が担体内部に滞留し、固定化酵素周辺のpHが局部的に低い値に長時間維持されたままになっていることによるとと思われる。今後、生成速度の低下が起こらないような担体の選定や比活性を高めるための固定化法の検討が必要である。

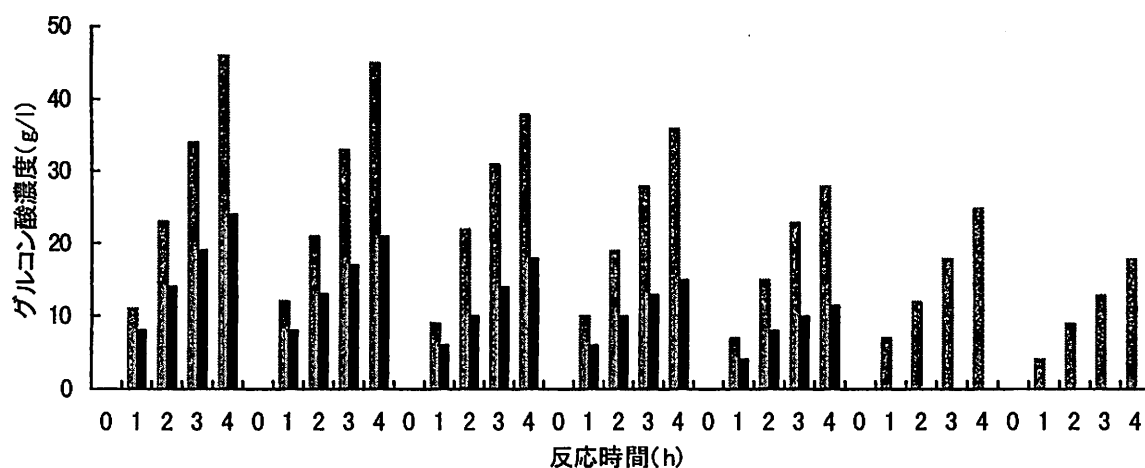


図6.3-1 固定化酵素による酸素2気圧下におけるグルコン酸生成の反復回分反応

■ 緩衝液 ■ 濃縮ニンジン汁

6.3.4項 小 括

固定化酵素により反復回分反応を行うと、反応回数が増える度にグルコン酸生成速度は徐々に低下し、グルコースを含む緩衝液では6回以上、濃縮ニンジン汁では4回以上反応を繰り返すと反応開始時の半分以下の生成速度になった。

6.4節 グルコン酸を含む酵素反応液を用いた新しい液状食品

6.4.1項 序 文

酵素GODを使用することにより、酸味料等の添加物を用いなくて酸味の乏しい原料だけで適度な酸味を有するものに変換できるため、新規な清涼飲料や酸性調味料素材等の様々な液状食品への利用を図ることが可能と考えられる。

そこで、ニンジン汁を原料とした100%清涼飲料やキウイフルーツ、ナシ果汁を原料とした酸性調味料素材の製造を行った。

6.4.2項 実験方法

濃縮ニンジン汁酵素反応液の清涼飲料への利用においては、GODを用いた酵素反応後の濃縮ニンジン汁を蒸留水と濃縮ニンジン汁原液を用いて希釈調整したグルコン酸含有ニンジン飲料（Brix11.0、pH4.3）と濃縮ニンジン汁を蒸留水と市販クエン酸を用いて希釈調整したクエン酸含有ニンジン飲料（Brix11.0、pH4.3）を製造し、官能検査を行った。評価は酸味の「爽快さ」と「まろやかさ」、「甘さ」及び好ましさととしての「おいしさ」の4項目について、15名をパネラーとして0～4点で評点する評点法で行った。

「爽快さ」は0；非常に悪い、4；非常に良い、「まろやかさ」は0；まろやかでない、4；非常にまろやか、「甘さ」は0；甘くない、4；非常に甘い、「おいしさ」は0；おいしくない、4；非常においしいとした。

キウイフルーツ及びナシ果汁酵素反応液の酸性調味料素材への利用においては、これらの反応液98mlにエタノール2%を添加し、それぞれの原料果実酒で前培養した酢酸菌 *Acetobacter aceti* IF0 3283菌液10mlを接種して、30℃で振とう培養により酢酸発酵を行った。有機酸組成は5.1.2項と同様に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。

6.4.3項 結果及び考察

グルコン酸またはクエン酸により酸味を付与したニンジン飲料の官能検査の結果を表6.4-1に示す。酵素GODにより生成したグルコン酸を含有するニンジン飲料（グルコン酸濃度10.7g/l）は、まろやかさに加えてクエン酸と同程度の爽快な酸味を持つものであった。このように、GODを利用するとニンジン等の酸味の乏しい農産物原料だけで酸味を持ったものに変換でき、GODを利用した新しい清涼飲料の開発に繋がるものと期待された。このニンジン飲料は（株）ふくれんのジュース加工工場において、「人参活菜」や「旬鮮果菜」という缶ジュース名で製品化され、現在市販されている。

表 6.4-1 異なる酸で酸味を付けたニンジンジュースの官能評価

主要な有機酸	酸 味		甘 さ	おいしさ
	爽快さ	まろやかさ		
クエン酸	3.0±0.6	2.7±0.5	3.2±0.4	3.1±0.6
グルコン酸	3.1±0.6	3.2±0.7*	2.5±0.5**	3.0±0.7

注) 1.クエン酸は市販のものを添加し、グルコン酸はニンジンジュース中で酵素により生成させた。

2. ** ; 1% 有意、* ; 5% 有意。

表 6.4-2 酢酸発酵による有機酸組成の変化

果 汁	有機酸	成分含量 (g/l)	
		酵素処理液 (発酵開始時)	酢酸発酵液 (発酵9日目)
キウイフルーツ	グルコン酸	24.1	22.2
	クエン酸	11.1	11.1
	リンゴ酸	6.2	6.3
	キナ酸	8.3	8.2
	酢酸	0	16.3
	計	49.7	64.1
ナ シ	グルコン酸	39.8	33.4
	クエン酸	1.0	1.0
	リンゴ酸	8.6	6.4
	酢酸	0	18.2
	計	49.4	59.0

また、酵素GODによりグルコン酸を生成させたキウイフルーツやナシ果汁を用いた酢酸発酵における有機酸組成の変化を表6.4-2に示す。発酵開始9日目には、キウイフルーツ及びナシ果汁がそれぞれ16.3及び18.2g/lの酢酸が生成している。グルコン酸は酢酸菌に消費されたためかわずかに減少している。これらの酢酸発酵果汁は、果汁原料本来の有機酸と酵素反応により生成されたグルコン酸及び酢酸菌により生成された酢酸を合わせ持つ、複雑な強い酸味を持つものとなった。酢酸発酵後の果汁3部と市販醤油1部を混合したものは、酸性調味料様ドレッシングとして好ましいものであり、新しい酸性調味料素材への可能性が示唆された。

6.4.4項 小 括

酵素GODにより生成したグルコン酸を含有するニンジン飲料（グルコン酸濃度10.7g/1）は、まろやかさに加えてクエン酸と同程度の爽快な酸味を持つものであった。また、同様にグルコン酸を生成させたキウイフルーツやナシ果汁を酢酸発酵させたものは、果汁原料本来の有機酸と酵素反応により生成されたグルコン酸及び酢酸菌により生成された酢酸を合わせ持つ、複雑な強い酸味を持つものとなった。これらの酵素処理液は、これまでにない新しいタイプの清涼飲料や酸性調味料素材として好ましいものであった。

第7章 リアクターによる野菜搾汁液中のシュウ酸除去及びシュウ酸定量

健康志向の高まりに伴い、野菜類の農産物搾汁液を原料にした様々な飲料が製造されている。しかし、これら原料農産物の中にはカルシウムの体内吸収を阻害し、腎臓結石との関連が示唆されているシュウ酸を多く含むものがあり、味覚上からも好ましくない。

農産物搾汁液中のシュウ酸を除去するには、カルシウム塩を添加してシュウ酸カルシウムとして析出させる方法や、イオン交換樹脂を用いる方法が考えられるが、前者の方法では析出・分離に長時間を要したり、除去するための十分量を添加することが法律上不可能であったり、添加物から遊離した酸により風味が損なわれたりする。また、後者ではシュウ酸以外の陰イオンをも除去してしまうという欠点がある。

これに対し、シュウ酸だけを分解するような酵素を用いれば原料素材の風味を損なうことなく、短時間で特異的にシュウ酸を除去することが可能になると考えられる。

一方、シュウ酸の測定には高速液体クロマトグラフを利用する方法や高価な精製酵素を用いる方法があるが、食品製造の現場等では精度よりも迅速性、簡易性及び経済性が重視されている。

そこで、シュウ酸分解酵素としてシュウ酸オキシダーゼを含み、容易に、かつ大量に採取できる大麦の乾燥麦芽根を用いて攪拌式及び充填式のリアクターを利用し、緩衝液やショウガ搾汁液中のシュウ酸の分解除去を行った。

さらに、この酵素を含む乾燥麦芽根を利用したフローインジェクション分析(FIA)システムによる野菜搾汁液中のシュウ酸定量について検討した。

7.1節 麦芽根シュウ酸オキシダーゼによるショウガ搾汁液中のシュウ酸分解

7.1.1項 序 文

シュウ酸を分解する酵素にはシュウ酸デカルボキシラーゼとシュウ酸オキシダーゼがあるが、シュウ酸デカルボキシラーゼはシュウ酸の分解に伴って味覚的に好ましくない蟻酸を生成するため、この酵素を食品製造に利用することは適当でない。一方、シュウ酸オキシダーゼはシュウ酸の分解に伴って過酸化水素を生成するものの、過酸化水素を分解するカタラーゼは食品添加用酵素剤として安価で市販されているため、この酵素を食品製造に利用しても問題はないものと考えられる。

そこで、シュウ酸を分解するためのシュウ酸オキシダーゼ(E.C. 1.2.3.4., 以下、OX0)の酵素素材として、大麦、ソルガム、細菌及びコケ(CHIRIBOGA 1966, PUNDERら 1989, KOYAMA 1988, SUZUKIら 1965)の中からビール醸造時の麦芽採取後に大量に産生し、かつ食品への利用に際し、安全性が高い麦芽根を選定した。

このOX0を含む麦芽根を用いたシュウ酸分解のための通気攪拌式リアクターによる反復回分反応及び充填式リアクターによる連続反応について検討した。

7.1.2項 実験方法

供試原料として、シュウ酸分解試験に供したシュウ酸溶液は和光純薬工業(株)製シュウ酸を378mg/l濃度(10×Km(CHIRIBOGA 1966))含む0.1Mコハク酸緩衝液(pH3.5)

(SUGIURAら 1979)を用いた。また、農産物にはガン予防効果が高いとされる (CARAGARY 1992) 野菜の中から、シュウ酸含量が多いショウガを選定した。ショウガをミキサーで粉碎した後、搾汁し、セライト 545でろ過清澄化して試料液とした。リアクターによるシュウ酸分解の試験には、これを脱イオン水で10倍に希釈し、クエン酸でpH3.5に調整したもの(シュウ酸濃度90mg/l)を用いた。

OXOを含む麦芽根はSUGIURAら(1979)の方法を参考に、大麦‘ミハルゴールド’の種子を20℃で10日間発根させ、根部を切り取り80℃で3分間加熱処理した。これにアセトンを加え脱水後、乾燥させた。細胞壁に強く結合したOXO (BERNAら 1997)の抽出は収率が低いために行わず、乾燥させた麦芽根を固定化酵素とみなして、そのまま、あるいは細断(1mm)しただけで供試した。乾燥麦芽根のOXO活性は-20℃で1ヵ月以上安定であった。

酵素単位と酵素活性の決定にあたっては、乾燥麦芽根に過酸化水素を基質とするパーオキシダーゼ(E.C.1.11.1.7)の活性も認められたので、酵素単位は過酸化水素の生成量ではなく、シュウ酸の分解量をもとに換算した。すなわち、シュウ酸を含む緩衝液に麦芽根を添加し、溶存酸素の供給が十分となるような酸素加圧1atm、攪拌速度400rpm、液中への酸素通気量1000ml/minという条件下(山下ら 1997)、37℃、pH3.5で1 μ mol/minの速度でシュウ酸を分解する酵素量を1Uとした。この条件下で、乾燥麦芽根のOXO活性は87 U/gであった。

麦芽根OXOに及ぼす温度とpHの影響を調べる試験では、100ml容三角フラスコに細断(1mm)した0.01gの乾燥麦芽根とシュウ酸を含む0.1Mコハク酸緩衝液10mlをいれ、酸素ポンベによる酸素1atm加圧下、往復振とうにより反応させ、シュウ酸の減少量を測定した。麦芽根OXOの反応至適温度と熱安定性を調べるため、前者はpH3.5で10分間反応させ、後者はそれぞれの温度にpH3.5で2時間放置した後、37℃で10分間反応させた。また、至適pHとpH安定性を求めるため、前者は37℃で10分間反応させ、後者はそれぞれのpHに37℃で3時間放置後、pH3.5で10分間反応させた。

酵素活性に及ぼすショウガ試料液の添加割合を調べる試験では、0.1Mコハク酸緩衝液とショウガ試料液との混合液にシュウ酸を900mg/l濃度になるように添加し、コハク酸とNaOHでpH3.5に調整した試験液10ml及び細断した乾燥麦芽根0.01gを100ml容三角フラスコに入れ、酸素ポンベによる酸素1atm加圧下、往復振とうさせてシュウ酸の減少量を測定した。

通気攪拌式リアクターによるシュウ酸の分解では、反応槽に2000ml容通気攪拌式ジャーファーメンター(サクラ精機製TBR-2、190mmL $\times$ 110mmID)を用いて、1000ml規模でシュウ酸の分解反応を行った。酸素ポンベによりリアクターのヘッドスペースを酸素で置換した後、酸素1atm加圧下、温度40℃、攪拌速度400 rpmで反応させた。また、反応開始2時間後にただちに新鮮緩衝液と交換して反応を続ける反復回分反応も行った。

充填式リアクターによるシュウ酸の分解では反応槽に23ml容ガラスカラム(130mmL $\times$ 15mmID)を用いて、乾燥麦芽根2g(174 U)を充填し、酸素ポンベによりカラムの空隙を酸素で置換した後、カラム上部から原料液を滴下する下向流方式により、温度40℃で反応させた。空間速度(SV)はカラム総容積(V)と通液量(f)から算出し、 $SV=f/V$ (h⁻¹)とした。

シュウ酸分解速度(v)は減少したシュウ酸濃度(C)、通液量(f)及び麦芽根(e)から算出し、 $v=C \times f/e$ (mg/h $\cdot$ g-麦芽根)とした。

シュウ酸は試料を0.2 μ mのメンブレンフィルターでろ過した水溶性のものについて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定した。

高速液体クロマトグラフ：島津製作所（株）製LC-6A、カラム：島津製作所（株）製SCR-101H（30cmL×7.9mmID）、カラム温度：40℃、移動相：過塩素酸で調整した水（pH 2.1）、流速：0.8ml/min、検出波長：210nm、注入量：5 μ l

酵素反応の確認は、生成する過酸化水素の呈色によるSUGIURAら（1979）の方法によった。

7.1.3項 結果及び考察

精製OXOを用いたSUGIURAら（1979）は、反応至適温度は35℃で70℃以下では極めて安定であると報告している。乾燥麦芽根そのままを用いた本試験では図7.1-1に示すように、反応至適温度は55℃付近にあり、これ以上の温度では急速に活性が低下するが、90℃までは活性が認められた。また、60℃までは2時間安定であったが、それ以上の温度では活性の低下が認められ、80℃に2時間保つと活性が無くなった。また、精製OXOの反応至適pHは3.2（SUGIURA 1979）、粗酵素ではpH3.5（CHIRIBIGA 1966）と報告されているのと同様に、本試験においても図7.1-2に示すようにpH3.5付近が最も活性が高く、pHが高くなるに伴って急激に活性が低下するが、pH6.0までは活性が認められた。また、pH3.5付近が最も安定であり、pH4～7まではその75%程度の活性が維持された。これらのことから、本酵素をシュウ酸を含有する農産物搾汁液に使用し効率的なシュウ酸分解を図る場合、反応温度では50～60℃が採用できるため微生物対策上有利であるが、pHでは特に野菜搾汁液の場合、pHが5～6の範囲にあるものが多いため酸添加等によるpH調整が必要になると思われる。

ショウガ搾汁原液を用いたシュウ酸の分解においては、乾燥麦芽根だけでなく、精製OXO（ベーリンガー・マンハイム（株）製、大麦起源）を用いても酵素反応によるシュウ酸の減少が認められないことから、緩衝液に対する試料液の添加割合と酵素活性の変化を検討した。結果を図7.1-3に示す。試料液の添加割合が増加するほど酵素活性は低下し、試料液100%ではわずか4%の活性しか発揮されないことが判明した。試料液に対して加熱処理、プロテアーゼ処理、EDTA添加、PVPP添加、陽イオン交換樹脂などによる処理を行っても活性の増加は認められなかった。しかし、透析または陰イオン交換樹脂による処理を行うと、緩衝液を用いた時に近い活性が発揮された。これらのことから、活性低下の原因はマイナスに荷電した低分子物質の影響によるものと推察された。

SUGIURAら（1979）は 10^{-3} M濃度のNaCl、 Na_2SO_4 及び NaNO_3 が精製OXOの活性をそれぞれ43、75及び16%まで低下させると報告している。試料液の Cl^- 、 SO_4^{2-} 及び NO_3^- の濃度をイオンクロマトグラフにより測定した結果、それぞれ3.6、5.3及び 6.4×10^{-3} Mの値であり、ショウガ試料液におけるOXOの活性低下には、これらの陰イオンが複合的に関与していると推察された。

通気攪拌式リアクターによる緩衝液中のシュウ酸分解では、378mg/l濃度のシュウ酸を含む緩衝液1000mlを出発原料として、乾燥麦芽根1gを用いてシュウ酸分解に及ぼす酸素加圧の影響を検討した。また、同時に酸素1atm加圧下で滞留時間2時間の回分反応を繰り返して行った。結果を図7.1-4に示す。空気常圧下及び酸素加圧下のいずれも乾燥麦芽根1g（87 U）を使用しているにもかかわらず、空気常圧下では酸素加圧下と比べて分解速度が低いことから、溶存酸素の供給が律速になっていると思われる。酸素加圧下におけるシュウ酸分解の初速度は452mg/h $\cdot$ g-乾燥根にも達した。また、回分反応を繰り返す度に急速に分解速度が低下し、3回目の反応では初回反応開始時の半分以下の分解速度になったが、3回目終了した反応6時間における総シュウ酸分解量は974mg/h $\cdot$ g-乾燥根に達した。それぞれの反応終了後の緩衝液中には酵素活性は認められないことから、

これらの分解速度の低下は酵素の漏出によるものではなく、失活によるものと思われる。

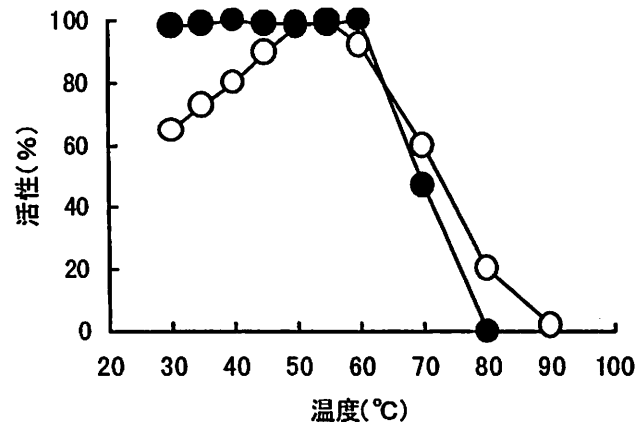


図7.1-1 麦芽根のシュウ酸オキシダーゼに及ぼす温度の影響

—○— 相対活性 —●— 残存活性

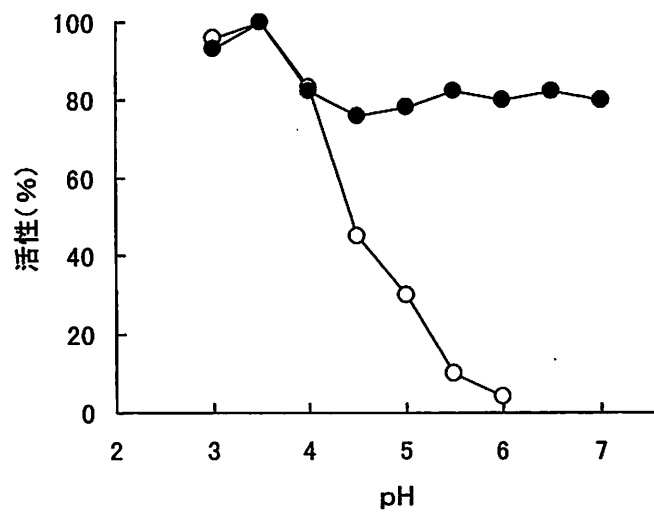


図7.1-2 麦芽根のシュウ酸オキシダーゼ活性に及ぼすpHの影響

—○— 相対活性 —●— 残存活性

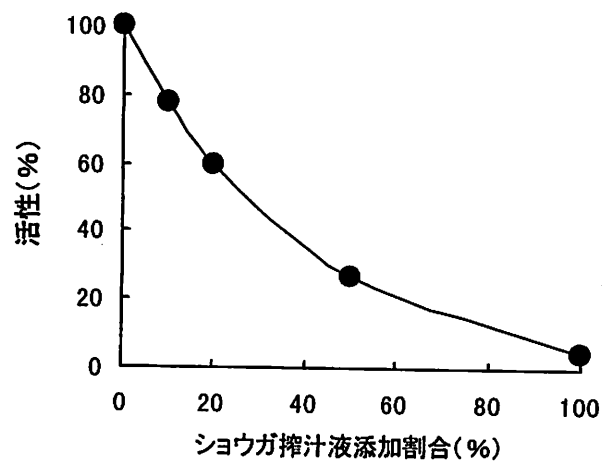


図7.1-3 麦芽根のシュウ酸オキシダーゼに及ぼすショウガ搾汁液添加量の影響

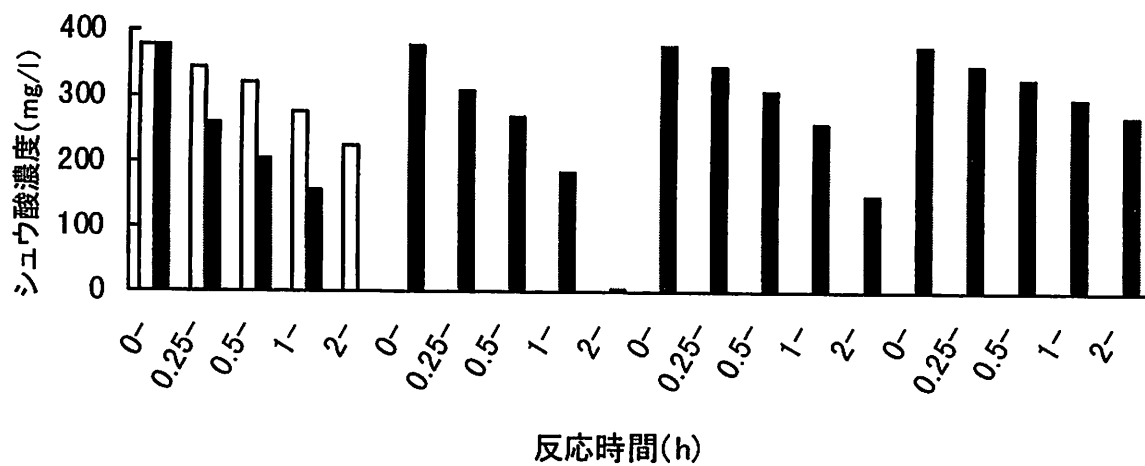


図7.1-4 通気攪拌式リアクターにおける緩衝液中のシュウ酸の反復回分分解反応

□ 0 atm air ■ 1 atm O₂

また、ショウガ搾汁液中のシュウ酸分解では、クエン酸でpH3.5に調整した10倍脱イオン水希釈のショウガ搾汁液（シュウ酸濃度90mg/l）1000mlに乾燥麦芽根1gまたは3gを添加し、ショウガ搾汁液中におけるシュウ酸濃度の変化を空気常圧下または酸素加圧下で追跡した。図7.1-5に示すように、時間の経過に伴ってシュウ酸濃度が減少しているが、緩衝液の時ほど速やかでない。また、酸素加圧下では空気常圧下にくらべて分解速度が向上しているが、その初速度は104mg/h・g-乾燥根に留まっている。さらに、3gの乾燥根を使用した場合、使用量に比例したシュウ酸の減少は見られないが、反応開始2時間後にはシュウ酸はほとんど消失している。より大量の麦芽根を使用し、それに応じた溶存酸素の供給を行えば、さらに短時間でのシュウ酸分解が可能であることを示している。このようにして得られたシュウ酸を含有しない搾汁液には、酵素反応により生じた過酸化水素の存在が呈色反応により確認された。この搾汁液にカタラーゼ（E. C. 1. 11. 1. 6）処理と加熱処理を行い、呈色反応が認められなくなるまで過酸化水素を分解除去したものは、ショウガ特有の風味を保持し、その味覚はシュウ酸に由来すると思われる苦みが消失しており、非常に好ましいものであった。

充填式リアクターによるシュウ酸分解では、2gの乾燥麦芽根を充填したガラスカラム上部から酸素を通気しながら、シュウ酸を含む緩衝液または10倍脱イオン水希釈ショウガ搾汁液を種々の流速で滴下した時の流出液のシュウ酸濃度の変化を図7.1-6に示す。通気攪拌式と同様、緩衝液に比べてショウガ搾汁液ではシュウ酸の分解速度が約23~37%まで低下した。空間速度SV=41.7h⁻¹（960ml/h）で通液した時のシュウ酸分解速度は、緩衝液では77mg/h・g-乾燥根に、ショウガ搾汁液では28mg/h・g-乾燥根に留まった。また、同じ緩衝液を一定の空間速度SV=21.5h⁻¹（495ml/h）で連続的に通液したときの流出液のシュウ酸濃度と分解速度を図7.1-7に示す。連続的に通液すると通気攪拌式の場合と同様に分解速度の低下が起こり、徐々にシュウ酸濃度の高い流出液になった。通液開始5時間後には初発速度の半分以下に分解活性が低下し、通液6時間後における総シュウ酸分解量は233mg/g-乾燥根に留まった。

一般的に、充填式リアクターは単位体積当たりの固定化酵素の負荷量を大きくできるので、反応効率では最も優れている（千畑ら 1991）とされる。しかし、単位乾燥麦芽根当たりのシュウ酸分解量で比較すると、図7.1-4と図7.1-7より反応開始6時間後の総シュウ酸分解量において、通気攪拌式リアクターの方が充填式よりも4倍以上優れていた。

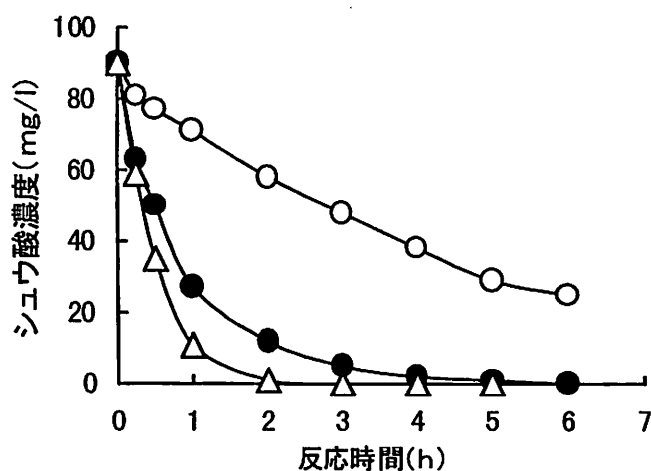


図7.1-5 通気攪拌式リアクターにおけるショウガ搾汁液のシュウ酸分解に及ぼす酸素加圧と麦芽根量の影響

○ 0atm air-1g麦芽根 ● 1atm O₂-1g麦芽根
△ 1atm O₂-3g麦芽根

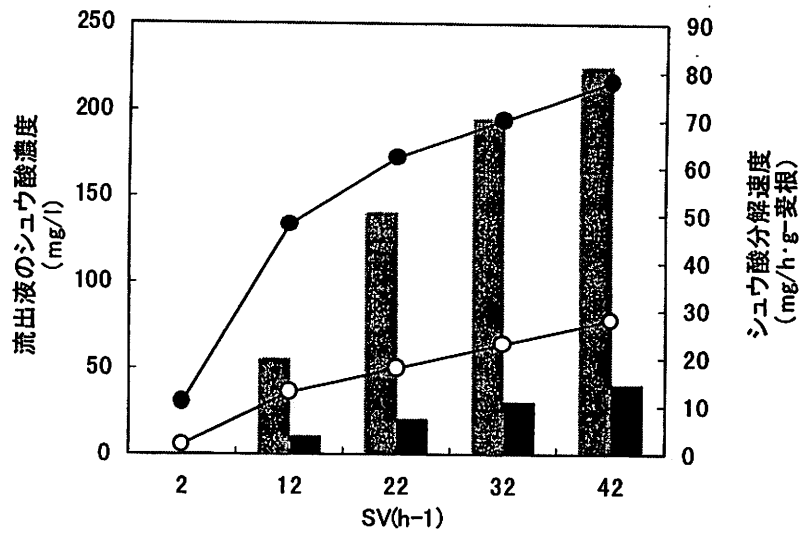


図7.1-6 充填式リアクターにおける緩衝液とショウガ搾汁液のシュウ酸分解に及ぼす流速の影響

■ 緩衝液中のシュウ酸濃度
 ■ ショウガ搾汁液中のシュウ酸濃度
 ● 緩衝液中のシュウ酸分解速度
 ○ ショウガ搾汁液中のシュウ酸分解速度

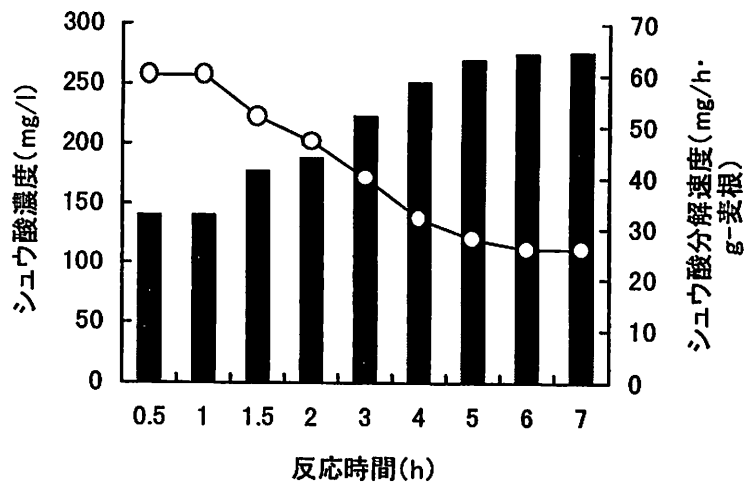


図7.1-7 充填式リアクターにおける緩衝液中のシュウ酸の連続分解

■ シュウ酸濃度 ○ シュウ酸分解速度

7.1.4項 小 括

通気攪拌式や充填式のリアクターを利用して、シュウ酸オキシダーゼにより緩衝液やショウガ搾汁液中のシュウ酸除去を試みた。通気攪拌式リアクターにより酸素加圧1atm下でシュウ酸オキシダーゼを含む乾燥麦芽根を反応させると、反応開始15分間のシュウ酸分解速度は緩衝液では452mg/h・g-乾燥根に、ショウガ搾汁液では104mg/h・g-乾燥根に達した。また、反復回分反応を行うと、反復回数が増える度にシュウ酸分解速度は急速に低下し、3回目の反応では初回反応開始時の半分以下の分解速度になった。充填式リアクターにより酸素通気を行いながら空間速度 $SV=41.7h^{-1}$ で通液したときのシュウ酸分解速度は、緩衝液では77mg/h・g-乾燥根に、ショウガ搾汁液では28mg/h・g-乾燥根に留まった。

7.2節 麦芽根シュウ酸オキシダーゼを用いたフローインジェクション分析による野菜搾汁液中のシュウ酸の定量

7.2.1項 序 文

シュウ酸を酵素法により定量するには、シュウ酸デカルボキシラーゼ（山中ら 1983、Liら 1989、Kohlbecker 1981）やシュウ酸オキシダーゼ（Yamatoら1994、Rahniら 1986）を利用する方法がある。しかし、これらの方法は、精製酵素を用いるためにバッチ法で測定する場合には極めて割高になり、また固定化酵素を利用する場合にはその固定化処理が煩雑になる。さらに、これらの方法は、医療や臨床において尿中のシュウ酸濃度測定が主であり、野菜搾汁液への適用はみあたらない。

そこで、シュウ酸オキシダーゼを含み、容易に、かつ大量に採取できる大麦の乾燥麦芽根を利用して野菜搾汁液中のシュウ酸を分解させ、生成する過酸化水素を測定することによりシュウ酸を定量するバッチ式測定法を検討した。さらに、この乾燥麦芽根を固定化酵素として使用したフローインジェクション分析システムによる検討も行った。

7.2.2項 実験方法

試料としたシュウ酸の標準溶液は0～400mg/l濃度のシュウ酸（和光純薬工業（株）製）を含む水溶液を、緩衝液には10%のメタノールを含む0.1Mコハク酸緩衝液（pH 3.5）を用いた。メタノールは、生成した過酸化水素や呈色物質の安定性と抽出率の向上（慶田ら 1981）のために使用した。

供試原料のハウレンソウ、ミョウガ及びショウガは、ミキサーで粉碎し搾汁した。これらの野菜搾汁液100ml当たりにはアスコルビン酸がそれぞれ4.5、1.7及び1.4mg含まれていた。東野ら（1983）の方法を参考にアスコルビン酸オキシダーゼ（E.C. 1.10.3.3.）を含むキュウリのアセトンパウダーの添加によりアスコルビン酸を分解した。すなわち、搾汁液100mlにアセトンパウダー0.5gを添加して30℃で30分インキュベートした後、95℃で10分間加熱し、ポアサイズ0.2 μm のメンブランフィルターでろ過した。残存アスコルビン酸をペルオキシダーゼと過酸化水素を利用する須田ら（1995）の方法で測定したところ、残存は認められず、本操作によりMcIlvaine緩衝液100ml当たりアスコルビン酸15mgまで完全に除去が可能であった。分析には、この搾汁ろ過液を脱イオン水で2～20倍に希釈したものを供試した。

供試酵素のシュウ酸オキシダーゼ（E.C. 1.2.3.4., 以下, OXO）は、7.1.2項と同様に

麦芽根から調製した。ペルオキシダーゼ (E.C. 1.11.1.7., 以下, POD) はワサビ起源の市販精製酵素 (和光純薬工業 (株) 製) を150mg/l濃度の水溶液で、また、過酸化水素の呈色試薬には、OXOの至適pHが3.5付近にある (山下ら1999) ので、pH3.5付近でも呈色度が大きく、高感度で安定な色素を形成 (辻ら1987) するABTS (2,2'-アジノジ (3-エチルベンズチアゾリン) -6'-スルホン酸) (和光純薬工業 (株) 製) を5mM濃度の水溶液で用いた。

OXOの酵素単位は既報 (山下ら 1999) に従い、40℃、pH3.5で1 μ mol/minの速度でシュウ酸を分解する酵素量を1 Uとした。この条件下で、乾燥麦芽根のOXO活性は85 U/gであった。

バッチ式反応でシュウ酸を酵素で完全に分解した後、生成した過酸化水素を最後に呈色させることによりシュウ酸を推定する方法 (分解後呈色法) を検討するために、50ml容ビーカーに細断 (幅1mm) した0.05g (4 U) の乾燥麦芽根と緩衝液4.0mlおよび400mg/l濃度のシュウ酸水溶液0.5mlを入れ、38℃で反応させ、経時的にポアサイズ0.2 μ mのメンブレンフィルターで約200 μ lをろ過採取した。そのうちの100 μ lにPOD溶液40 μ lとABTS溶液40 μ l、さらに希釈のために緩衝液320 μ lを加えて、生成した過酸化水素を呈色させた後、マイクロプレートリーダーを用いて405nmで吸光度を測定した。また残りの100 μ lは高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて残存するシュウ酸量を測定することにより、残存および酸化分解シュウ酸量の収支を検討した。

また、バッチ式反応で酵素と呈色試薬等を混在させることにより生成する過酸化水素を逐次連続的に呈色させ、シュウ酸を推定する方法 (連続呈色法) を検討するために、50ml容ビーカーに細断 (幅1mm) した0.05g (4 U) の乾燥麦芽根と緩衝液4ml、400mg/l濃度のシュウ酸水溶液0.5ml、POD溶液 0.5ml及びABTS溶液0.5mlを入れ、38℃で反応させながら継時的にポアサイズ0.2 μ mのメンブレンフィルターで約200 μ lをろ過採取し、405nmで吸光度を測定した。

さらに、連続式反応で酵素カラムによりシュウ酸を分解した後に、POD溶液とABTS溶液を混合することにより呈色させ、シュウ酸を推定する方法 (フローインジェクション分析 (FIA)) を検討するための装置の概略を図7.2-1に示す。酵素反応を行う部位には、ポアサイズ0.2 μ mのメンブレンフィルター (DISMIC-13CP、アドバンテック東洋 (株) 製、外径17mm) の試料注入部に0.03g (3 U) の乾燥麦芽根を充填したものをを用いた。試料注入は、POD溶液とABTS溶液を流し始めて、ベースラインの吸光度が安定する約30秒後に行った。試料注入後、ピークが出現した時点で、POD溶液とABTS溶液の送液を停止した。ピーク高は、ベースラインが安定した点 (約30秒後) からピーク頂点までを測定した。

酵素カラム及び呈色反応の温度: 38℃、キャリアー溶液: 10%のメタノールを含む0.1Mコハク酸緩衝液 (pH3.5)、キャリアー溶液流速: 1.0ml/min, ABTS溶液流速: 0.3ml/min、POD溶液流速: 0.3ml/min、検出波長: 405nm、注入量: 10 μ l。

シュウ酸は、7.1.1項と同様に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。

酵素カラム及び呈色反応の温度: 38℃、キャリアー溶液: 10%のメタノールを含む0.1Mコハク酸緩衝液 (pH3.5)、キャリアー溶液流速: 1.0ml/min, ABTS溶液流速: 0.3ml/min、POD溶液流速: 0.3ml/min、検出波長: 405nm、注入量: 10 μ l。

シュウ酸は、7.1.1項と同様に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。

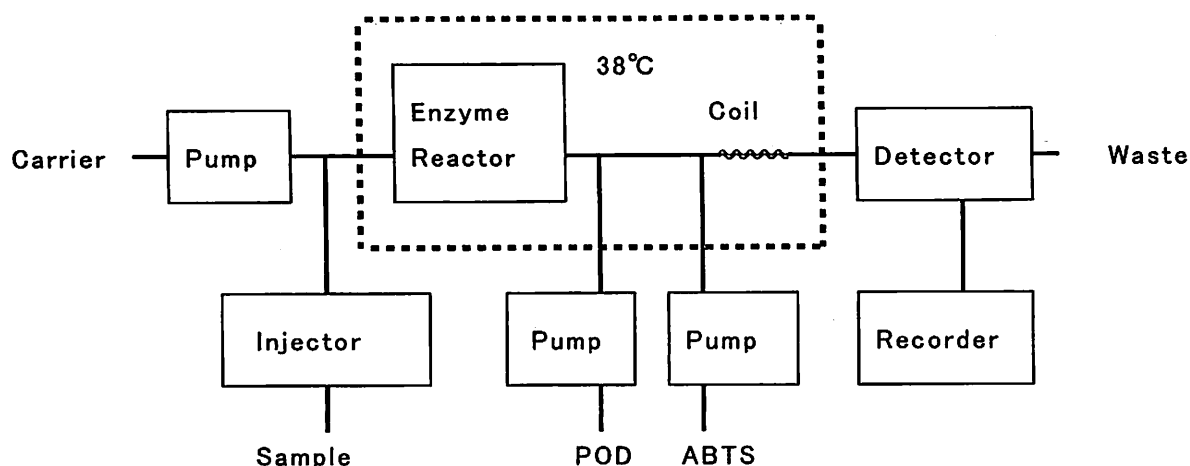


図 7.2-1 FIA 装置の概略

POD: パーオキシダーゼ

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

7.2.3項 結果及び考察

酵素を含有する乾燥麦芽根を用いてバッチ式反応により定量する方法では、バッチ毎に使用する酵素単位を均一にできないために、一定時間における生成量等で含量を推定することができず、基質すなわちシュウ酸が完全に分解されるまで反応を行う必要がある。

分解後呈色法における経時的な呈色液の吸光度とHPLCによる残存シュウ酸のピーク高の変化を図7.2-2に示す。HPLCによるシュウ酸のピーク高は、酵素反応の進行に伴い時間の経過とともに急速に減少し、酵素反応開始30分後にはほぼピークが認められなくなり、シュウ酸はほぼ完全に分解されたと考えられる。一方、シュウ酸の分解に伴い生成する過酸化水素による呈色液の吸光度は、酵素反応開始10分までは急速に増加したが、徐々に増加が緩慢となり、20分後以降では逆に減少に転じた。したがって、HPLCにより算出される酸化分解シュウ酸量と呈色液の吸光度の変化挙動との間には物質収支上の一貫性が認められなかった。この分解後呈色法において、反応20分以降に呈色液の吸光度が減少に転じたことは、市販の過酸化水素水溶液をシュウ酸溶液の代わりに添加しても同様の結果になること、および乾燥麦芽根を添加せずに過酸化水素水溶液を添加した場合にはこのような減少が認められないことから、酵素反応により過酸化水素が生成して

も、時間の経過とともに徐々に有機物である麦芽根と反応し、結果的に過酸化水素濃度が減少したためと考えられる。したがって、生成する過酸化水素を逐次、呈色試薬と反応させれば、生成した過酸化水素をすべて吸光度の増加に結びつけることができると考えた。

そこで生成した過酸化水素を逐次呈色させる連続呈色法について検討した。連続呈色法における経時的な反応液の吸光度の変化を図7.2-3に示す。吸光度は反応開始5分程度でピークに到達し、その後は減少に転じた。これは、酵素反応が起こった麦芽根の部位を中心に染色されていることから、呈色色素が麦芽根組織へ吸着されたものと考えられる。この現象は呈色試薬ABTSだけに限らず、オルトフェニレンジアミンやフェノールと4-アミノアンチピリンを呈色試薬にした場合にも認められた。

以上のことから、バッチ方式ではシュウ酸濃度の推定が困難であると考えられたため、生成した過酸化水素と乾燥麦芽根との接触時間をキャリアー溶液の流速により自由に設定できるFIAを検討した。さらに、麦芽根への呈色色素の吸着が起こらないように、酵素反応の後に呈色させるポストカラム方式にした。OXOを含有する乾燥麦芽根は細胞膜に強く結合しており、組織として用いる限り麦芽根から容易に脱離しないと報告されている (BERNAら 1997)。したがって、細断 (1mm) した麦芽根を前述のメンブレンリアクターに充填し酵素リアクターとし、FIA法に適用した。酵素反応により生成した過酸化水素の呈色液が与えるFIAチャートを図7.2-4に示す。最初のなだらかなベースラインの上昇は、ABTS溶液とPOD溶液によるものであり、呈色液のピークが出現した後のベースラインへの復帰は、ピーク出現後にABTS溶液とPOD溶液の送液を停止しているためである。このピーク高と液体クロマトグラフのピーク高をプロットしたシュウ酸の検量線を図7.2-5に示す。図7.2-5から明らかなように、FIA法、HPLC法ともにそれぞれのピーク高さは標準試料溶液の濃度と高い相関関係を示した。また、呈色の安定性を検討するために、200mg/l濃度のシュウ酸溶液を10回連続して注入したところ、ピーク高の変動係数は3.1%であった。

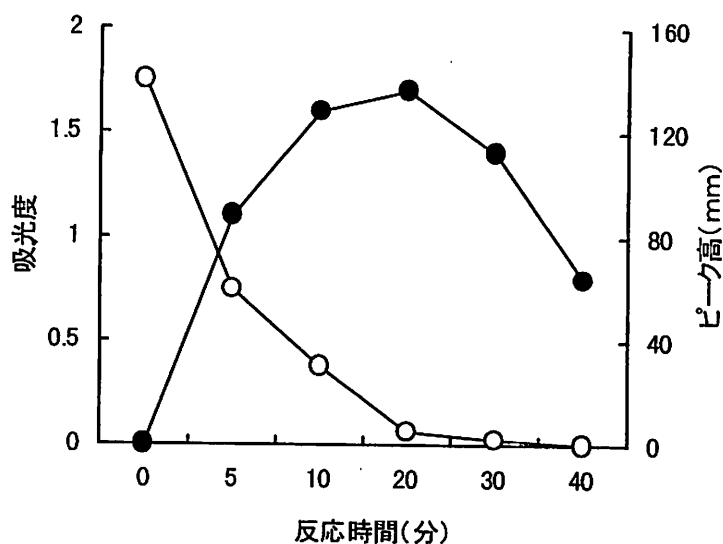


図7.2-2 シュウ酸の分解後呈色法における吸光度とHPLCによるピーク高の経時変化

—●— 吸光度 —○— ピーク高

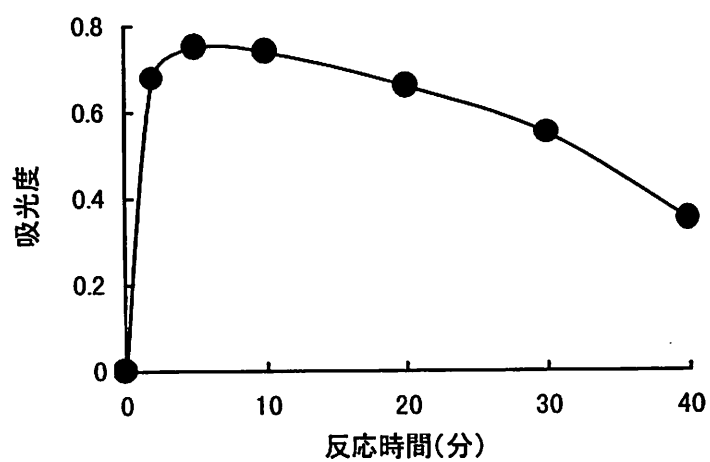


図7.2-3 連続呈色法におけるシュウ酸の酸化分解に伴う吸光度の経時変化.

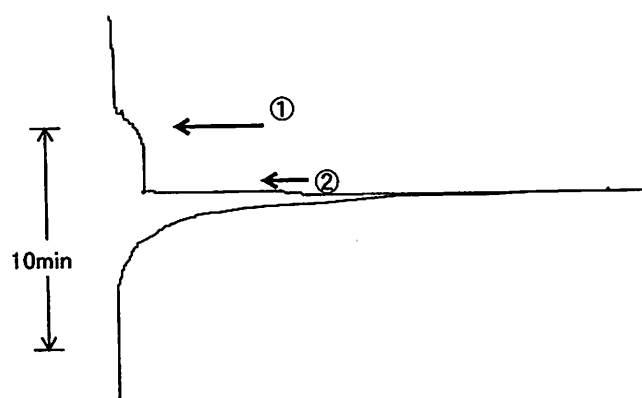


図7.2-4 20倍に希釈したホウレンソウ搾汁液中のシュウ酸に対するFIAクロマトグラム

①: ABTSとPOD溶液混合、②: 試料注入

なお、カラム内の酵素活性は、38℃、メタノールを含む0.1Mコハク酸緩衝液(pH3.5)中において12時間は安定であった。より長期間の使用も可能と考えられたが、本法の固定化酵素カラムは麦芽根細片をそのまま利用するものであり、カラムの更新にわずか数分を必要とするのみであるので、毎日更新することとし、安定性について特に検討は行わなかった。

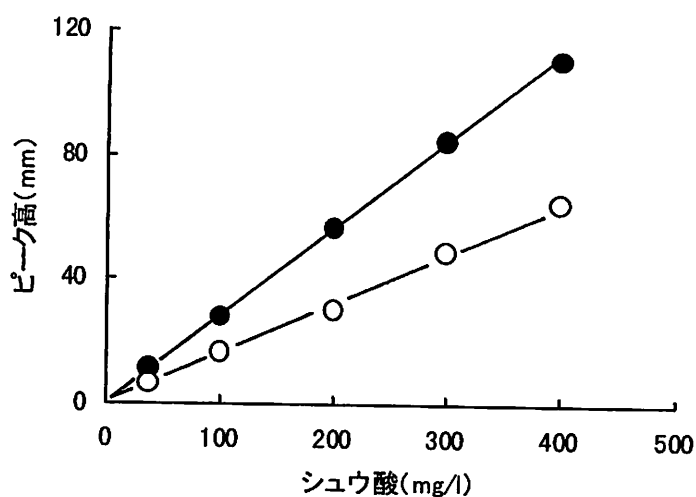


図7.2-5 FIAとHPLCによるシュウ酸の検量線

● HPLC(210nm) ○ FIA(405nm)

表 7.2-1 FIA法とHPLC法のシュウ酸分析比較

搾汁液	シュウ酸 (mg/100ml)	
	FIA	HPLC
ホウレンソウ	382± 5	363± 2
ミョウガ	224± 11	225± 2
ショウガ	121± 6	123± 1

注) 値は3反復の平均±SD

このFIAを用いてメンブランフィルターでろ過し、脱イオン水で希釈した種々の農産物搾汁液のシュウ酸を測定した。また、同時にHPLCを用いた測定も行った。結果を表7.2-1に示す。FIAを用いて推定された農産物搾汁液のシュウ酸濃度は、HPLCによる値と良好に一致した。

FIAにより良好なシュウ酸濃度値の推定ができたことは、使用したメンブランフィルターの試料注入部容積約 0.06cm^3 に 0.03g の乾燥麦芽根を充填し、 1.0ml/min の流速で移動相を通液しているため、空間速度 (SV) が 1000h^{-1} という大きな値となり、生成した過酸化水素が極めて短時間に乾燥麦芽根が充填された部位から流出し、結果的に過酸化水素の減少量が無視できるほどの微少に留まったためと思われる。

また、既報 (山下ら 1999) で報告したように、乾燥麦芽根にはPOD活性もある。したがって、キャリアー溶液にABTSだけを添加しておけば、呈色が起こる。しかし、このような大きい空間速度であっても、麦芽根に微量の色素が吸着され、この色素が完全に麦芽根から溶出し、ベースラインが元に復帰するまで約40分を要し、実用的ではなかった。

7.2.4項 小 括

シュウ酸オキシダーゼを利用して農産物搾汁液中のシュウ酸を定量するために、この酵素を含有する乾燥麦芽根を組み込んだフローインジェクション分析による測定を試みた。

シュウ酸の標準試料水溶液の濃度と、これらの水溶液に酵素を反応させたときに生成する過酸化水素の呈色による吸光度のピーク高は、高い相関を示した。このフローインジェクション分析により推定される農産物搾汁液中のシュウ酸含量は、HPLCにより算出される含量と良好に一致した。

また、 200mg/l 濃度のシュウ酸溶液を10回連続してフローインジェクション分析で測定したとき、吸光度のピーク高の変動係数は 3.1% であった。

第8章 総 括

近年、食の多様化に伴う消費者ニーズの変化や輸入農産物の増加等の影響により、国内で生産される農産物の価格は低迷し、生産過剰傾向が危惧されている農産物が多い。これらの農産物の中でも特に永年作物である果樹は、野菜とは異なり、植え付けてから結実し、収入が得られるようになるまで長期間を要するため、栽培農家が需要の動向に即座に対応し、栽培作物を転換することは困難である。このため、果実の消費低迷に対する対応策としては、当面、需要の拡大を図ることが不可欠となっている。

ミカンの生産過剰に伴う生産調整の結果、ミカンからの転換によりキウイフルーツの生産が急増した。この結果、今度はキウイフルーツが生産過剰傾向になってきた。

本研究では、主にこのキウイフルーツを取り上げ、収穫から貯蔵・追熟条件及びこれを原料にした液状食品の製造について検討した。特に製造方法については、微生物、酵素を利用したバイオリアクターを用いる方法について検討した。本章では農産物を原料に微生物、酵素を用いた食品加工の現状と問題点及び今後の展望について総合的に考察する。

第3章の果実酒の製造においては、酸味が少ないカキに酒石酸を添加して搾汁し、醸造したカキ酒は思いがけない高品質のものとなったが、キウイフルーツは独特のえぐみを有するキナ酸を10g/l程度含むために、発酵により糖が減少した分、キナ酸のえぐみを呈する果実酒となった。そこで、キナ酸の酸味を生かした特色あるキウイフルーツの液状食品を製造するために、第4章では果実酢を、第5章では酸性調味料素材への利用を検討した。キウイフルーツは、このような酸味を持つ食品への利用が適していると思われる。

第4章と第5章で果実酢や酸性調味料製造のために利用した酢酸菌や麹菌は好気性であり、生産性を向上させるために固定化等の操作によりリアクター内に生産活性の高い菌をいくら増やそうとも、酢酸やクエン酸を効率的に生成させるためには微生物菌体に如何に酸素を取り込ませるかがカギになる。このため、通常の穀類を原料にした効率的な食酢製造においては、液体中への酸素の溶解込みやすさ、すなわち KLa を増加させるため通気攪拌による深部発酵が一般的となっている。しかし、原料にキウイフルーツ等の果汁を使用した場合、原料液中に通気を行うと、発泡が著しく、発酵操作を継続することさえできず、固定化によりリアクター内の菌数を増加させることが無意味となる。

これに対し、従来から食酢製造において静置発酵で利用されている、空気中の酸素を酢酸菌に直接摂取させる方式で酢酸菌膜を大量に充填固定できれば、発泡しやすい原料を用いても発泡することなく、生成速度も優れたバイオリアクターが開発できると考え、リアクターに通気分散用チューブとともに木綿織布を縦詰めに蛇腹状に詰め込む方式を考案した。これによる酢酸生成速度は、キウイフルーツ酒を用いても極めて高い値を達成するとともに、長期の発酵期間中に死滅などによって生産活性が消滅した菌は担体から脱落し、リアクター外に流出することにより生産活性の高い菌が自然に維持される現象が見受けられた。さらに、この方法は、攪拌操作だけでなく、消泡処理も不必要となり、菌の固定化が容易で高い生産性と長期安定性も確保できるため、地域の特産農産物を原料に食酢製造を行うには導入しやすいリアクターであると考えられる。今後、通気に酸素を富化した空気を用い、表面積がより大きい担体を選定し、固定化された菌に空気が十分に行き渡るような通気方法に改良することにより、さらに生産性は向上すると思われる。

しかし、この方法を第5章の麹菌を用いたクエン酸発酵に利用すると、麹菌の伸長した菌糸が担体に充満し、酸素の均一な供給が行われなくなり、生産性は低下した。そこで、クエン酸発酵では従来の通気攪拌による深部発酵を行い、通気に伴う発泡をクエン酸生成促進効果を有する大豆油添加の消泡作用で解決した。ただし、この方法により生産された果汁原料のクエン酸発酵液は、果汁中への通気により果汁本来の香気が消滅したものとなった。果汁を原料とする液状食品への麹菌利用は、発酵開始3~4日目で麹菌を取り除き、これまでに生成された好ましい麹香により原料の風味を改善し、素材とすることが現実的な一つの方向であるように思われる。

第3~5章では微生物を用いた液状食品の製造を行った。微生物は、古くから、味噌、醤油、みりん、酒、ヨーグルト、納豆など多くの食品製造に用いられてきた。地球上の多くの微生物の中から有用な微生物を探索し、これを利用することによって、これまでに無い新しい特性を持った加工食品を開発することはそれほど難しいことではないと思われる。しかし、このとき最も懸念されることは、食品としての安全性についてであろう。この観点から、本研究では第3章の果実酒、第4章の果実酢及び第5章の酸性調味料素材の製造のすべてにおいて経験的に安全性が確認されているワイン酵母、酢酸菌、焼酎用やみりん用麹等の微生物を選定し用いた。微生物は生育環境に応じて、様々な成分を消費し、種々の物質を生産する。この結果、微生物による発酵は香気や呈味性が原料素材とは大きく異なってくるため、食品として好ましいものが製造できるかどうかは、実際に農産物を原料に微生物による発酵を行ってみたいと予想できないことが多い。

一方、微生物を利用する発酵が種々の成分変化を起こすことに対して、酵素を利用する反応は特定の成分変化であるため、酵素処理後の品質変化や安全性について予想しやすく、食品製造には都合が良い。しかし、微生物と異なり、酵素は自己増殖が不可能であり大量に準備することが困難であること、反応の過程で徐々にもしくは急速に活性を失うこと、抽出に手間暇がかかること等がネックとなっている。したがって、現場段階で実用化、すなわち製品化を目指して酵素を食品加工に利用する場合、あらたに探索した微生物等から抽出した酵素を用いることは、その微生物をどこで大量に培養し、抽出を行うのが問題になる。これらの施設を持っていない製造部門においては、食品添加用として市販されている比較的安価な粗酵素や容易に入手できる酵素含有物を利用した食品開発を図らなければならない。これらの観点から、第6章のグルコン酸生成では市販食品添加用酵素剤を、第7章のシュウ酸除去ではビール醸造時に大量に産生する麦芽根を使用した。

また、第6章や第7章で使用したグルコースオキシダーゼやシュウ酸オキシダーゼの酸化酵素も酢酸菌や麹菌と同様に溶存酸素を必要とするため、効率的に酵素反応を進めるためには如何に溶存酸素を高めるかがカギとなる。この時、通気に酸素を用いても、加圧操作を行ったりしても、微生物とは異なり酵素がダメージを受けることはないため、発酵法よりも生成量を飛躍的に増加させやすく、短時間で反応を終了させることができる。このため、酵素を食品製造に利用できれば、発酵法に比べて微生物に汚染される危険性が少なく、原料風味を保持した加工食品が製造できる。

第6章では、使用する酵素として微量のグルコースや溶存酸素の除去等にしか利用されていない市販食品添加用グルコースオキシダーゼに着目し、酵素反応によりビフィズス菌増殖活性機能を持つとされるグルコン酸を大量に生成させることにより、原料液中の糖と酸の比率のみならず、呈味性を変化させた酵素処理液をそのまま高付加価値の食品素材として利用することを目指した。酵素を利用する食品製造において、このような利用方法は今までなかったことから、酵素の新しい利用方法を提案するものとする。

第6章で示した農産物以外にも、スイカ、メロン、リンゴ、サツマイモやハチミツ等に対して当然利用できるため、地域特産物を利用した新しい加工食品の製造に活用されることを期待している。さらに、最近では健康に寄与する成分、いわゆる機能性成分を有する食品が注目されている。食品の機能性については、最近、様々な研究が行われ、いろいろな成分に種々の機能性があることがわかってきた。このような食品製造に、酵素を利用し、原料素材だけで機能性成分を豊富に含有する食品に仕上げることは、今後の食品製造における酵素の利用法として極めて有望であると考ええる。

しかし、食品の機能性についての多くは試験管レベルの結果であり、ヒトの口から入って様々な消化液と消化管を通過して吸収されたときに実際に試験管と同様に機能性を発揮できるかどうかは、明らかでない場合が多い。これに対し、摂取することが人体に好ましくない成分を含む食品からこれを除去すれば、相対的に食品としての機能が高まることになる。このような観点から、第7章では人体が摂取することが好ましくない物質として、農産物に含まれるシュウ酸に着目した。シュウ酸を食品中から除去するには様々な方法が考えられるが、対象が野菜ジュース等に加工利用する搾汁液の場合、シュウ酸だけが除去できるような方法が望ましい。そこで、基質特異性の高い酵素シュウ酸オキシダーゼに着目した。しかし、市販のシュウ酸オキシダーゼは高価であるため、低コスト、安全性及び大量調達の点からビール醸造時の麦芽採取後に大量に産生するシュウ酸オキシダーゼを含む大麦根の利用について研究を行った。シュウ酸オキシダーゼは細胞膜に強固に固定されていたので、抽出することなく大麦根をそのまま固定化酵素として使用することにより、シュウ酸の酵素分解を図った。さらに、この大麦根をシュウ酸の定量に利用することを検討し、FIA法による分析法を提案した。バイオリアクターの発展の過程において、固定化酵素法が固定化増殖微生物法に発展したように、細胞・組織内の酵素を利用する場合に抽出を行わなくても反応が起こる場合には、細胞・組織をそのまま利用の方が経済的にも労力的にも優れた方法であると考ええる。今後、このような組織をそのまま利用することにより、食品素材の機能性が簡易に明らかにできるような方向に発展させたい。

本論文において主に加工原料として用いたキウイフルーツにはポリフェノールが多く含まれている。最近、ポリフェノールの機能性については様々な知見が報告されており、今後、キウイフルーツの機能性について明らかにしていくことは、需要を喚起する新しい切り口の一つであろう。

後 記

本研究の遂行及び本論文のとりまとめから作成にあたって、懇切な指導と校閲を賜った九州大学農学部教授松本 清博士に衷心から感謝し、厚くお礼を申しあげる。

本研究の遂行および本論文の作成に当たって、終始温情ある助言と激励を賜った九州大学農学部教授江頭和彦博士に心から謝意を表する。

本研究の遂行にあたり共同で研究を行う中で、種々有益な助言と協力を賜った福岡県工業技術センター生物食品研究所の関係各位に対して心から感謝申しあげる。

本研究を遂行するにあたり種々有益な助言と指導を賜った元福岡県農業総合試験場長松本明芳博士、元生産環境研究所流通加工部流通利用研究室長（現、化学部土壌管理研究室長）平野稔彦氏に衷心より謝意を捧げる。また、研究を実施するにあたり、協力を惜しまれなかった工業技術センター生物食品研究所食品課及び農業総合試験場生産環境研究所流通加工部の関係各位に対して心から感謝申しあげる。さらに、果汁の提供にご協力頂いた株式会社ふくれん江島宏代表取締役専務に深く感謝します。

参 考 文 献

- ASANO, T., YUASA, K., KUNUGITA, K., TERACHI, T. and MITSUOKA, T. (1993): Effects of Gluconic Acid on the Human Faecal Microflora. SOCIETY FOR MICROBIAL ECOLOGY AND DISEASE (SOMED) ANNUAL MEETING. PROGRAM AND ABSTRACTS. p13.
- 浅野敏彦・湯浅一博・榎田清彦・寺地 務・光岡知足 (1993) : グルコン酸の *Bifidobacterium* 増殖活性. 日本栄養・食糧学会講演要旨集, p111.
- BERNA, A and BERNIER, F. (1997): Regulated Expression of a Wheat Germin in Tobacco : Oxalate Oxidase Activity and Apoplastic Localization of the Heterologous Protein. *Plant Mol. Biol.*, 33, 417-429.
- CARAGARY, A. B. (1992) : Cancer Preventive Foods and Ingredients. *Food Technol.*, 46, 65-68.
- CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T. and MORI, T. (1976) : Methods in Enzymology (Mosbach, K., ed.). Academic Press, New York, 44, p. 746.
- 千畑一郎・土佐哲也・松野隆一・佐藤忠司・森 孝夫 (1991) : 固定化生体触媒 (講談社, 東京), 千畑一郎編, p. 338.
- CHIRIBOGA, J. (1966): Purification and Properties of Oxalic Acid Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 516-523.
- CHUNG, B. H. and CHANG, H. N. (1988): Aerobic Fungal Cell Immobilization in a Dual Hollow-Fiber Bioreactor : Continuous Production of a Citric Acid. *Biotech. Bioeng.*, 32, 205-201.
- 藤井秀明・山下純隆・馬場紀子・森山弘信・古田正範・末永 光・大田修明・山口 剛 (1999) : 液状食品素材の製造方法. 特許公報, 第 2852206 号.
- 福家洋子・松岡弘厚 (1982) : キウイフルーツの生育中および追熟後の糖, 澱粉, 有機酸, 遊離アミノ酸の変化. 日食工誌, 29, 642-648.
- 福井作蔵 (1973) : 還元糖の定量法 (東京大学出版会, 東京), 15-17.
- FUKUSHIMA, Y., ITOH, H., FUKAE, T. and MOTAI, H. (1991): Stimulation of Protease Production by *Aspergillus oryzae* with Oils in Continuous Culture., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 586-590.
- 福島弥一・岡田王春・伊藤春通・深瀬哲朗・茂田井宏 (1991) : *Aspergillus oryzae* の連続培養によるプロテアーゼの生産. 菌糸の形態変化に伴う攪拌に対する抵抗力の変化. 醸工, 6, 441-446.
- 福島弥一・深瀬哲朗・茂田井宏 (1993) : 醤油製麹工程への連続液体培養の応用. 醸協., 88, 50-55.
- GHOMMIDH, C., NAVARRO, J. M. and DURAND, G. (1982) : A Study of Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter* Cells : Oxygen Transfer. *Biotech. Bioeng.*, 24, 605-617.
- GIBSON, Q. H., SWOBADA, B. E. P. and MASSEY, V. (1964): Kinetics and Mechanism of Action of Glucose Oxidase. *J. Biol. Chem.*, 239, 3927-3934.
- HEATHERBELL, D. A., STRUEBI, P., ESCHWENBRUCH, R. and WITTH, L. M. (1980): A New Fruit Wine from Kiwifruit: A Wine of Unusual Composition and Riesling Sylvaner Character. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 114-121.
- 日高秀昌・平山 男 (1985) : フルクトース転移を行なう微生物・植物酵素. 化学と生物, 23, 600-605.
- 日高秀昌・栄田利章・足立堯・斉藤安弘 (1987) : フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発. 農化, 61, 915-923.

- HORITU, H., ADACHI, S., TAKAHASHI, Y., KAWAI, K. and KAWANO, Y. (1985) : Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Immobilized in Polyacrylamide Gels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 8-12.
- 伊藤三郎・橋永文男 (1985) : エチレンによるキウイフルーツの追熟促進. 鹿児島大学農学部学術報告, 35, 49-53.
- 慶田雅洋・伊藤誉志男・外海泰秀・鈴木英世・小川俊次郎・長谷川敬彦・田中慶一・近藤雅臣・藤井正美 (1981) : 食品中の過酸化水素の微量測定法について—紫外吸光度法, 蛍光法および 4-アミノアンチピリン比色法の比較—, 農化, 55, 483-489.
- JERNEJC, K., PERDIH, A., and CIMERMAN, A. (1982) : Citric Acid Production in Chemically Defined Media by *Aspergillus niger*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 29-33.
- JERNEJC, K., PERDIH, A., and CIMERMAN, A. (1991) : ATP : Citrate Lyase and Carnitine Acetyltransferase Activity in a Citric-acid-producing *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 92-95.
- JULIANO, B. O. : A Simplified Assay for Milled-Rice Amylose. *Cereal Science Today*, 16, 334-360.
- 春見隆文 (1993) : 食品微生物バイオテクノロジー、農林水産技術会議事務局編 (農林統計協会発行), 19, 121-136.
- 梶谷裕二 (1994) : キウイフルーツ果実軟腐病菌 (*Dothiorella* sp.) の完全世代, 日植病報, 60 : 339.
- 梶谷裕二 (1996) : キウイフルーツ果実軟腐病菌 (*Phomopsis* sp.) の完全世代, 日植病報, 62 : 643.
- KOHLBECKER, G. and BUTZ, M. (1981) : Direct Spectrophotometric Determination of Serum and Urinary Oxalate with Oxalate Oxidase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 19, 1103-1106.
- 講談社サイエンティフィック編 (1992) : 食品中の食品添加物分析法解説書 (講談社, 東京), p. 463, p. 468.
- KOYAMA, H. (1988) : Purification and Characterization of Oxalate Oxidase from *Pseudomonas* sp. OX-53. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 743-748.
- 久保秀彦 (1983) : キウイフルーツの成熟期における成分変化および収穫期を異にした果実の追熟後の品質. 静岡柑試研報, 19, 69-70.
- LI, M. G. and MADAPPALLY, M. M. (1989) : Rapid Enzymatic Determination of Urinary Oxalate. *Clin. Chem.*, 35, 2330-2333.
- 真子正史 (1982) : キウイフルーツの貯蔵方法と出庫後の品質変化に関する試験. 神奈川園試研報, 29, 18-28.
- MATSUMOTO, K., KAMIKADO, H., MATSUBARA, H. and OSAJIMA, Y. (1988) : Simultaneous Determination of Glucose, Fructose, and Sucrose in Mixtures by Amperometric Flow Injection Analysis with Immobilized Enzyme Reactor. *Anal. Chem.*, 60, 147-151.
- 森 明彦・照井暁造 (1972) : 深部培養による酢酸発酵の動力学的研究 (第 2 報). 醸工, 50, 70-78.
- 森 明彦 (1996) : バイオリアクターによる食酢の醸造—生産物濃度と生産速度の考察—. 農化, 70, 694-697.
- 森山弘信・山下純隆・馬場紀子 (1994) : バイオリアクターによる果汁を原料にした酸性調味料の生産. 第 1 報 クエン酸生産能力の高い菌株の選定. 福岡県農総試研報 B-13, 73-76.
- 森山弘信・山下純隆・馬場紀子 (1996) : バイオリアクターによる果汁を原料にした酸

- 性調味料の生産. 第2報 油脂類の添加によるクエン酸生産性の向上. 福岡県農
 総試研報 15, 98-101.
- 本橋 登・金本尚代・久島祥子・山田香織(1988): キウイフルーツ成熟へのエチレンの
 役割. 農及園, 63, 593-596.
- MOYER, A. J. (1953): Effect of alcohols on the Mycological Production of Citric Acid in
 Surface and Submerged Culture. II. Fermentation of Crude Carbohydrates.
J. Appl. Microbiol., 1, 7-13.
- 永田賢嗣・栗原昭夫・高屋茂雄(1984): キウイ果実の軟腐症状の発生原因, 感染時期及
 び品種間差異について. 果樹試験場報告 E (安芸津), 5, 19-27.
- NANBA, A., KIMURA, K. and NAGAI, S. (1985): Vinegar Production by *Acetobacter rancens* Cells
 Fixed on a Hollow Fiber Module. *J. Ferment. Technol.*, 63, 175-179.
- OKUHARA, A. (1985): Vinegar Production with *Acetobacter* Grown on a Fibrous Support.
J. Ferment. Technol., 63, 57-60.
- OKUSE, I. and RYUGO, K. (1981): Compositional Changes in the Developing 'Hayward'
 Kiwi-Fruit in California. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106, 73-76.
- 大亦正次郎・河野又四・村瀬澤夫・酒井平一・外村健三(1982): 応用微生物学 (風館,
 東京), 170-173.
- 大田修明・末永光・長浜正治・山下純隆・平野稔彦・山口 剛(1989): 固定化酵母を用
 いたカキ, キウイフルーツワインの試醸. 日食工誌, 36, 903-909.
- 大屋敷春夫(1989): みりん用麹菌の適性評価と改良育種. 醸協, 84, 756-762.
- OSUGA, J., MORI, A. and KATO, J. (1984): Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter*
 Cells Entrapped in a κ -Carrageenan Gel. *J. Ferment. Technol.*, 62, 139-149.
- PATTERSON, B., PAINE, L. A., CHEN, Y. and GRAHAM, D. (1984): An Inhibitor of Catalase Induced by Cold
 in Chilling-Sensitive Plants. *Plant Physiol.*, 76, 1014-1018.
- PRATT, H. K. and REID, M. S. (1974): Chinese Gooseberry: Seasonal Patterns in Fruit Growth and
 Maturation, Ripening, Respiration. *J. Sci. Fd. Agric.*, 25, 747-757.
- PUNDIR, C. S. and KUCHHAL, N. K. (1989): Detection of an Oxalate Oxidase in Grain Sorghum Roots.
Phytochemistry, 28, 2909-2912.
- PUROHIT, H. J. and DAGINAWARA, H. F. (1986): The Relationship of Some Metal Ions with Citric Acid
 Production by *Aspergillus niger* Using Tamarind Seed Powder.
J. Ferment. Technol., 64, 561-565.
- RAHNI, M. A. N., GUILBAULT, G. G. and OLIVERA, N. G. de (1986): Immobilized Enzyme Electrode for the
 Determination of Oxalate in Urine. *Anal. Chem.*, 58, 523-526.
- 佐伯明比古(1990): アルギン酸カルシウムゲルを担体とした固定化酢酸菌による食酢の
 製造. 日食工誌, 37, 191-198.
- SAKURAI, H., LEE, H. W., SATO, S., MUKATAKA, S. and TAKAHASHI, J. (1989): Gluconic Acid Production at
 High Concentrations by *Aspergillus niger* Immobilized on a Nonwoven Fabric.
J. Ferment. Bioeng., 67, 404-408.
- 桜井明彦・今井 弘(1991): *Aspergillus niger* の表面培養によるデンプンからのクエン
 酸発酵. 醸工., 69, 471-475.
- 佐藤誠吾(1991): 高濃度溶存酸素によるバイオリクターの雑菌汚染防止. 農化, 65,
 193-196.
- SHEU, W. C. and FREESE, E. (1972): Effects of Fatty Acids on Growth and Envelope Proteins of
Bacillus Subtilis. *J. Bacteriol.*, 111, 516-524.

- 清水祥一・山根恒夫(1987)：バイオリアクターシステム（共立出版社，東京），77-80.
- SHU, P. and JOHNSON, M. J. (1947) : Effect of the Composition of the Sporulation Medium on Citric Acid Production by *Aspergillus niger* in Submerged Culture. *J. Bact.*, 54, 161-167.
- 須田郁夫・西場洋一・古田 収(1995)：酵素反応を利用したビタミンC定量法の改良，57, 41.
- 末永 光・古田正範・大田修明・山口 剛・山下純隆(1993)：横型隔室回転ドラム方式バイオリアクターによるカキ酢の連続生産．日食工誌，40, 275-277.
- SUGIURA, M., YAMAMURA, H., HIRANO, K., SASAKI, M., MORIKAWA, M. and TSUBOI, M. (1979) : Purification and Properties of Oxalate Oxidase from Barley Seedlings. *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2003-2007.
- SUZUKI, Y. and MEEUSE, J. D., (1965) : On The Nature of Moss Oxalic Acid Oxidase. *Plant Cell Physiol.*, 6, 25-36.
- TAKAHASHI, J., HIDAKA, H. and YAMADA, K. (1965) : Effect of Mycelial Forms on Citric Acid Fermentation in Submerged Mold Culture., *Agr. Biol. Chem*, 29, 331-336.
- TANIDA, M. (1996) : Catalase Activity of Rice Seed Embryo and Its Relation to Germination Rate at a Low Temperature. *Breeding Sci.*, 46, 23-27.
- 東野哲三・藤田修二(1983)：差スペクトル法による総ビタミンCの定量とその果汁試料への適用，日食工誌，30, 414-420.
- 辻 章夫・前田昌子(1987)：免疫学的測定法の検出法，蛋白質 核酸 酵素，別冊 31，酵素免疫測定法，51-63.
- 宇佐美昭次・福富直樹(1977)：パイナップル加工残渣搾汁を原料とする半固体培養法によるクエン酸発酵．醸造工学会誌，55, 44-50.
- 宇佐美昭次・桐村光太郎(1985)：クエン酸発酵工業の現状と将来展望．発酵と工業，43, 1032-1042.
- VAIJA, J., LINKO, Y. Y. and LINKO, P. (1982) : Citric Acid Production with Alginate Bead Entrapped *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Appl. Biochem. Biotech.*, 7, 51-54.
- 山中英明・久能昌朗・塩見一雄・菊池武昭(1983)：酵素法による食品中のシュウ酸の定量，食衛誌，24, 454-458.
- 山下純隆・松本明芳・平野稔彦(1985)：キウイフルーツ‘ヘイワードの時期別及び貯蔵中の果実成分の変化’．福岡県農総試研報 B-5, 31-34.
- 山下純隆・平野稔彦・松本明芳・茨木俊行(1987)：キウイフルーツの追熟に関する研究．第1報 エチレン濃度と追熟温度が貯蔵期間別果実品質に及ぼす影響．福岡県農総試研報 B-6, 33-38.
- 山下純隆・茨木俊行・平野稔彦・松本明芳(1988)：キウイフルーツの追熟に関する研究．第2報 果実の硬度，呼吸量及び品質に及ぼすエチレン処理の影響．福岡県農総試研報 B-7, 47-52.
- 山下純隆・茨木俊行・馬場紀子・平野稔彦(1988)：キウイフルーツの低温追熟におけるエチレンの効果．福岡県農総試研報 B-8, 53-58.
- 山下純隆・馬場紀子・平野稔彦 (1989)：酢酸生成に及ぼす酸素移動度の影響．福岡県農総試研報 B-9, 91-96.
- 山下純隆・馬場紀子(1990)：キウイフルーツの常温貯蔵技術の研究．福岡県農総試研報 B-10, 81-86.
- 山下純隆・大田修明・末永 光(1991)：木綿製織布に固定化した酢酸菌によるキウイフ

- ルーツ酢及びカキ酢の生成. 日食工誌, 38, 608-613.
- 山下純隆・馬場紀子・森山弘信(1993): 2 波長測定法とアミロース及びアミロペクチン測定への応用例. 日食工誌, 40, 365-369.
- 山下純隆・深堀奈保子・馬場紀子・古田正範(1997): グルコースオキシダーゼを用いた酸素加圧下におけるグルコン酸生成. 日食科工誌, 44, 164-168.
- 山下純隆(1998): グルコースオキシダーゼを用いて生成させたグルコン酸を含有する新しい野菜飲料. *New Food Industry*, 40, 73-78.
- 山下純隆・久保田朗・深堀奈保子(1998): 食品素材中のシュウ酸除去方法, 特願平10-201916.
- 山下純隆・久保田朗・深堀奈保子(1999): 麦芽根シュウ酸オキシダーゼを用いたショウガ搾汁液中のシュウ酸分解. 日食科工誌, 46, 346-351.
- 山下純隆・森山弘信(1999): バイオリアクターによる果汁を原料にした酸性調味料の生産. 第3報 麹菌 *Aspergillus niger* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 によるクエン酸の連続生産. 福岡県農総試研報, 18, 92-95.
- 山下純隆(2001): 発根麦芽を用いたフローインジェクション分析による野菜搾汁液中のシュウ酸定量. 日食科工誌, 48, 622-624.
- YAMATO, S., WAKABAYASHI, H., NAKAJIMA, S. and SHIMADA, K(1994) : Amperometric Determination of Oxalate in Plasma and Urine by Liquid Chromatography with Immobilized Oxalate Oxidase. *J. Chromatogr. B*, 656, 29-35.
- 山内文男(1992a): バイオリアクターによる調味料の製造. *New Food Industry*, 34, 6-16.
- 山内文男(1992b): 糸状菌を用いたバイオリアクター. 醸協, 87, 101-106.
- YASUI, Y., SUNEYA, Y. and MORI, A. (1978) : Behavior of Acetic Acid Bacteria Grown in Surface Culture toward Oxygen. *J. Ferment. Technol.*, 56, 266-272.
- 吉野 実(1975): 栄養診断のための栽培植物分析測定法(養賢堂, 東京), 作物分析法委員会編, 333-335.
- 吉田敏臣(1985): 微生物培養工学(共立出版, 東京), 田口久治・永井史郎編, p68.

Studies on the Quality of Agricultural Products in Storage and Processing and on the Production of Juicy Foods from Agricultural Products using Bioreactors

by

YAMASHITA Sumitaka

To increase the consumption of agricultural products in a tendency of supply over demand, the quality of kiwifruit was examined in growing, storing and ripening stages, and the continuous production of new juicy foods mainly from kiwifruit using different kinds of bioreactors was executed. The results of the study are summarized as follows.

1. Quality of kiwifruit under different conditions of harvest, storage and ripening

Compositional changes of 'Hayward' kiwifruit in the growing stage and in the ripening stage after harvest were examined during October and December. The total sugar content increased abruptly due to a rapid decrease in starch from the beginning of October.

Citric acid as titratable acidity slightly increased in December. Kiwifruit harvested at the beginning of December was evaluated to be in the best quality after ripening.

The effects of temperature during storage on the quality of kiwifruit were clarified. The low temperature prevented kiwifruit from ripening during storage. The effects of ethylene concentration, temperature and duration of exposure to ethylene, and temperature after removal of ethylene on the ripening of kiwifruit were investigated. Exposure to ethylene accelerated softening of fruits. Ripening at the temperature over 20 °C brought about rotting and decay of kiwifruit by microorganisms on the fruit surface, but it did not occur at the temperature of 15 °C. The best quality of the ripened kiwifruit was obtained when the fruits were exposed to ethylene at the concentration over 50 ppm at 20 °C for 24 h followed by standing in air at 15 °C after removal of ethylene.

2. Continuous production of wine using bioreactor with immobilized yeast cell

The alcohol fermentation of kiwifruit- and persimmon-juice was studied under the continuous production. Immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* kyokai No. 9 were entrapped in the sterilized condition using calcium alginate. When the kiwifruit-juice was provided into the reactor at residence times of 12 and 6 h, the ethanol concentration and the productivity were 11 and 10%, and 7.5 and 13.4 g/l·h, respectively. The same values were obtained for persimmon-juice.

Fermentation of both fruit-juices were continued for 50 days without microbial contamination. The sweet type gave the higher sensory scores for both kiwifruit- and persimmon-wine.

3. Continuous production of fruit-vinegar using bioreactor with fixed *Acetobacter aceti* cells

Continuous production of kiwifruit- and persimmon-vinegar was developed using cells fixed on the woven cotton fabrics. The fabrics were packed into a column and inoculated with *Acetobacter aceti* IFO 3283. *Acetobacter* cells were easily fixed on the cotton fabrics and showed good growth in the fixed condition. When the synthetic medium was used in the fermentation, the acetic acid production was achieved at the rate of 49.7 g/l·h with the concentration of 45 g/l.

The maximum production rate based on the total volume of the column including fabrics was 13.7 g/l·h. When the kiwifruit- and persimmon- wine were used in the fermentation, the production rate of acetic acid decreased a little but was still in the level of 7.4 and 5.2 g/l·h, respectively, on the basis of the total column volume with 45 g/l of the acetic acid concentration. The surface culture using growing cells fixed on the woven cotton fabrics was superior to the submerged culture involving aeration, from the viewpoint of the higher productivity and energy efficiency.

4. Production of sour seasoning-material using bioreactor with *Koji* mold

In order to select the most suitable microorganism for production of sour seasoning-material by the aeration-agitation culture, the productivity of citric acid and the formation of oxalic acid by *Koji* molds were examined under several conditions.

Among the molds which produce citric acid without formation of oxalic acid from the synthetic medium, *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 showed the highest production rate of citric acid under the aeration-agitation culture; the concentration of citric acid amounted to 35.6 g/l after 12 days from the start of fermentation.

The effects of oil added to the medium on the production of citric acid by *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 under aeration-agitation was investigated.

The highest yield of citric acid from the synthetic medium was obtained by addition of soybean-oil at 1.0%; in this condition the concentration of citric acid attained to 71.1 g/l after 14 days from the start of fermentation.

When kiwifruit-, persimmon- and pear-juice were fermented with addition of soybean-oil at 1.0%, the fermentative containing 48, 45 and 30g/l of citric acid, respectively, was produced after about 10 days from the start of fermentation.

A dual bioreactor in which the first tank was connected with the second tank was used for the continuous production of citric acid. The volume of both tanks was 1,000 ml. Addition of 5.7×10^8 spores to the first tank was done everyday while a part of the culture medium with mycelium of *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* IFO 6082 was drained from the second tank. When the synthetic medium was provided into the dual bioreactor at a dilution rate of 0.005 h^{-1} , the fermentative containing over 30 g/l of citric acid was produced continuously for 22 days at the production rate of 0.17 g/l·h of citric acid in average.

5. Production of gluconic acid in juice of agricultural products by glucose oxidase

Batch production of gluconic acid using free and co-immobilized glucose oxidase and catalase under increased oxygen pressure was investigated to enhance the production of

gluconic acid and to produce carrot- and kiwifruit-juice acidified with gluconic acid produced in it. During the first 10-min reaction 30 g of gluconic acid was produced in the buffer containing 100 g/l of glucose by reaction with the crude enzyme solution containing 17.4 mg protein under 2-atm oxygen pressure and 1,000ml/min oxygen aeration. The production of gluconic acid increased with an increase in oxygen pressure. When the concentrated carrot-juice of 1,000ml was used, gluconic acid was produced at the concentration of 52 g/l under 3-atm oxygen pressure after 6-h reaction. When kiwifruit-juice of 1,000ml was used, gluconic acid was produced at the concentration of 24 g/l under 3-atm oxygen pressure after 3-h reaction. Repetition of the batch production of gluconic acid by the co-immobilized enzyme was carried out in the buffer and in the concentrated carrot-juice under 2-atm oxygen pressure. The productivity of gluconic acid gradually decreased with the number of repetition and fell to a half of the productivity of the first reaction after repetition of more than 6 (buffer) or 4 (concentrated carrot-juice) times. When the concentrated carrot-juice processed by the enzymes was adjusted with water and the unprocessed concentrated carrot-juice, a pure carrot-juice with the taste of mildness and pleasant sourness of gluconic acid was produced.

6. Decomposition and determination of oxalic acid in vegetable-juice by oxalate oxidase

Decomposition of oxalic acid was examined in 0.1 M succinate buffer (pH 3.5) and in the diluted ginger-juice (adjusted to pH 3.5 by addition of citric acid) by addition of roots of barley seedlings containing oxalate oxidase, using the stirred-tank and packed-bed reactors. When oxalic acid was oxidized by oxalate oxidase in roots of barley seedlings under 1-atm oxygen pressure in the stirred-tank reactor, the decomposition rate of oxalic acid during the initial 15-min reaction reached to 452 mg/h·g-dry roots in the buffer solution containing oxalic acid of 378 mg/l and to 104 mg/h·g-dry roots in the ginger-juice (diluted by ten times with deionized water) containing 90 mg/l of oxalic acid. Repeated batch decomposition of oxalic acid resulted in a rapid decline from the initial decomposition rate with the increasing number of repetition, and the decomposition rate fell to a half of the initial rate after repetition of more than 3 times. When the decomposition of oxalic acid was carried out in the packed-bed reactor, the decomposition remained at the rates of 77 and 28 mg/h·g-dry roots for the buffer solution and the diluted ginger-juice, respectively, at SV of 41.7 h⁻¹. The concentration of oxalic acid in vegetable-juices was determined in a flow injection system by using roots of barley seedlings as an immobilized oxalate oxidase reactor. In the pretreatment of the extracted vegetable-juices, ascorbic acid was eliminated by the acetone-extracted powder of cucumber. Hydrogen peroxide produced from the decomposition of oxalic acid was reacted with ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonic acid)) reagent and peroxidase. The oxidized ABTS was determined spectrophotometrically at 405 nm. Coefficient of variation as the precision was 3.1% at the oxalic acid concentration of 0.2 mg/ml and in the 10 successive injections. The standard curve for oxalic acid in the system gave the correlation coefficient of 0.998. When the system was applied to some vegetable-juices, the measured values agreed well with those obtained with the HPLC method.

福岡県農業総合試験場特別報告
第17号

農産物の貯蔵・加工特性とバイオリアクターによる
液状食品製造に関する研究

発 行 平成14年3月
福岡県農業総合試験場
(福岡県筑紫野市吉木)

著 者 山 下 純 隆

印刷所 セントラル印刷株式会社