

多段連続バイオリアクターによる玉葱食酢製造*

高橋 淳** 菅野 亨*** 小林正義***

(平成5年5月6日受理)

Abstract

玉葱を原料とした食酢連続製造を、2段連続バイオリアクターを用いて約4%の玉葱酢を得ることに成功した。これまで一般的に用いられてきたアルギン酸カルシウムゲルによる包括法に代わり、多孔質セラミックを用いた担体結合法により、6ヵ月以上にわたる安定した醗酵を可能にした。さらに、反応器の環境因子(温度、基質流量など)を強制的に周期操作することにより定常操作よりも高い収率で反応物を得、その醗酵の動特性を計算機シミュレーションにより解析した。実験室レベルで製造した玉葱酢の一般市民による試飲アンケート結果から、味と色が濃く、独特の風味があり、ドレッシングに有効など商品化の可能性が示唆された。

Abstract

Onion vinegar was first produced continuously by using two continuous stirred tank reactors, and the acetic acid content formed was 4%. The advantage of stable production for a longer period of more than six months was reconfirmed by a new procedure to immobilize edaphon in a porous ceramic tube, as opposed to alginic acid calcium immobilization. For a high efficiency vinegar production, a new forced cyclic operation was developed, and a yield 16% higher than that of steady state operation was obtained. The dynamic behavior of acetic acid production was simulated by a simple model applied as a first approach. The onion vinegar produced was tested by 46 people, most of whom evaluated it as suitable as dressing.

1. 緒 言

オホーツク地域における玉葱の生産量は約26万トンで全道の約50%を占めている。一方、その出荷形態は大部分が原材料そのまま出荷されており、地域における収入も玉葱の場合20億円程度と見積もられ、極めて少ない。従ってこのオホーツク地域における食品原材料の生産品の高付加価値化は、地域経済発展のためのキーワードとなっているといっても過言ではない。

本研究では、この地域の日本一生産量を誇る玉葱を原材料とする食酢製造を、連続バイオリアクターを用いて行った。連続バイオリアクターは従来の方法である回分式に比べ生産性が非常に高く、しかも菌体を繰り返し使用することが出来る効率の良い生産手段である。研究の遂行にあたって具体的に以下の項目について検討した。

* 研究の一部を1992年化学学会室蘭地方大会及び触媒学会オーロラセミナーに発表した。

** 北見工業大学工学研究科化学環境工学専攻

*** 北見工業大学工学部化学システム学科

I. 連続バイオリアクター最適化のための基礎的研究

- (1) 連続バイオリアクター用最適固定化担体の開発及び反応装置の設計。
- (2) 生成物収率向上のための新しい周期操作法の開発。
- (3) 連続バイオリアクター制御のための動特性解析。反応器モデルの提出と計算機シミュレーション。

II. 玉葱食酢製造のための2段連続バイオリアクターの開発と製品製造

- (1) 長期連続運転と最適制御
- (2) 製造食酢の品質評価と付加価値向上への考察

2. 実験方法

2.1 酵母及び酢酸菌

北海道工業試験場から提供されたパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* AHU 3532, *Saccharomyces cerevisiae* AHU 3051), ビール酵母 (*Saccharomyces calshbergensis* AHU 3524, *Saccharomyces calshbergensis* AHU 3181), ワイン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae ver ellipsoideus* AHU 3078, *Saccharomyces cerevisiae* OC-2(協会7号)) を, 東京農業大学から提供された *Acetobactor aceti* TUA 549B をそれぞれ用いた。

2.2 玉葱ジュースの調製法

本研究では, 玉葱を家庭用ジューサーミキサーで圧搾, 次に濾過し反応基質である玉葱ジュースを得た。我々が用いた玉葱は, Table 1 に示すような美幌産及び端野産(くれない)赤玉葱を用いた。生成食酢の色はそれぞれ前者は淡黄色, 後者はワインレッド色であった。

Table 1. 各種玉葱ジュース組成とその醗酵理論値

| 品 種 | 糖濃度 (g/l) | | | | 理論醗酵による生成量 | |
|-----------|-----------|---------|----------|------|------------|---------|
| | Sucrose | Glucose | Fructose | 全量 | アルコール(g/l) | 酢酸(g/l) |
| 北海1号 | 9.9 | 20.9 | 16.1 | 46.9 | 24.0 | 31.3 |
| アーク | 8.5 | 25.6 | 16.5 | 50.7 | 25.9 | 33.8 |
| 北もみじ | 13.3 | 28.0 | 19.4 | 60.7 | 31.0 | 40.4 |
| 春ひぐま | 13.3 | 29.3 | 21.7 | 64.3 | 32.9 | 42.9 |
| オホーツク H86 | 13.7 | 30.6 | 23.7 | 68.0 | 34.8 | 45.4 |
| くれない | 23.2 | 29.6 | 26.8 | 79.6 | 40.7 | 53.1 |

2.3 菌体固定化法

固定化は異なる2つの方法(1)通常のアルギン酸カルシウムゲル包括法, (2)多孔性セラミック担体結合法を用い, 両者を比較した。後者には, 市販のシランリング(SiO_2 , 空隙率 $\epsilon < 0.7$, 有効表面積 $270\text{m}^2/\text{l}$, サイズ $15\phi \times 16\text{L} \times 3\text{H}$)及び粒子状セラミック(SiO_2 , 粒径 $2 \sim 10\text{mm}$, 細孔容積 $1 \sim 5\text{ml/g}$, 比表面積 $3 \sim 60\text{m}^2/\text{g}$, 細孔径 $5 \sim 40\mu\text{m}$)を用いた。これらセラミック担体を反応器内(酵母の場合 25°C , 酢酸菌の場合 30°C に保持してある)に充填後, あらかじめ各種菌体を培養してある培養液をマイクロチューブポンプにて 20ml/hr で送入 $3 \sim 4$ 日間循環させ, 菌体固定を安定化させた。

2.4 分析法

糖, エタノール, 有機酸の分析には島津社製高速液体クロマトグラフ LC-6A を, エタノール, 酢酸の分析には島津社製 GC-3BF 型 (FID) ガスクロマトグラフをそれぞれ用いた。夜間運転のために自動サンプリング装置 (東京理化社製 DC-40型) を用いた。

2.5 反応器及び実験操作法

各種菌体の活性特性を調べるために回分反応器を, 工業的実用化試験のために2段連続反応器を用いた。Fig. 1 にアルコール醱酵及び酢酸醱酵の2段連続反応システムの模式図を示した。各反応器はトレーサー試験により, 完全混合槽の理論曲線に一致することを確かめてある。連続2段反応器において前者のアルコール醱酵槽 (体積 $V_0=624\text{ml}$) では反応温度 $T=15\sim 35^\circ\text{C}$, 供給基質流量 $F=5\sim 30\text{ml/hr}$ (糖濃度 $47\sim 80\text{g/l}$) を, 酢酸醱酵槽 ($V_0=624\sim 724\text{ml}$) では $T=20\sim 40^\circ\text{C}$,

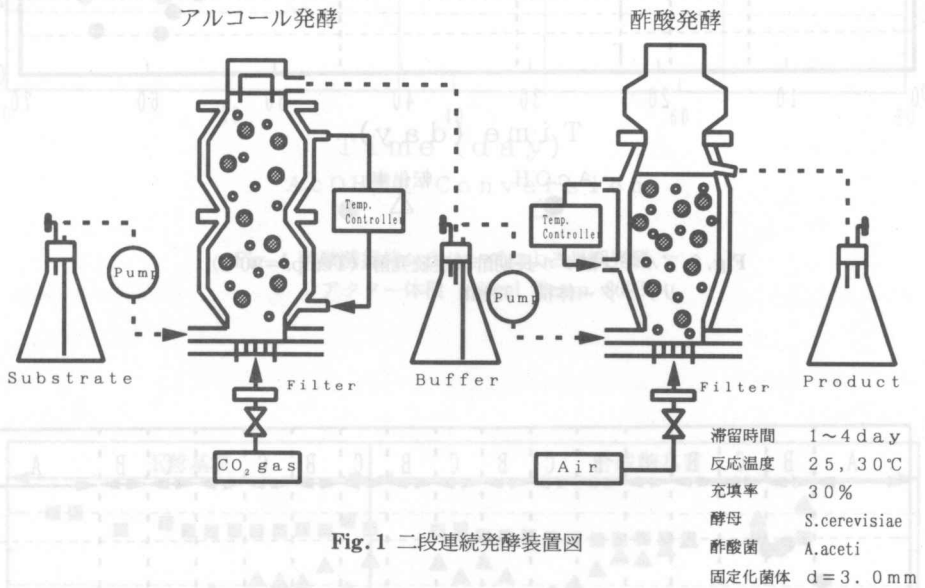


Fig. 1 二段連続発酵装置図

$F=5\sim 11\text{ml/hr}$ (アルコール濃度 $24\sim 41\text{g/l}$) をそれぞれ用いた。

3. 実験結果及び考察

3.1 菌体固定化法と連続反応における菌体活性の安定化

アルコール醱酵及び酢酸醱酵は共にアルギン酸カルシウムゲル包括法では30日程度の連続運転で活性低下の傾向が認められ, Fig. 2 に示すように酢酸醱酵における3ヵ月以内の使用では初期活性の50%以下にまで低下した。またこの低下傾向は, 反応条件の強制周期操作により一層加速されることが Fig. 3 の24時間醱酵温度周期操作の結果から分かった。

シランリングを担体に用いた酢酸醱酵の結果を Fig. 4 に, 粒状セラミックを用いたアルコール醱酵の結果を Fig. 5 にそれぞれ示した。シランリング及び粒状セラミック担体固定化法ではアルコール醱酵では 25°C , 酢酸醱酵では 30°C で3ヵ月以上の連続使用に転化率90%以上で安定性が確認された。更にこの方法では強制周期操作下においても同様な安定性が認められた。

1. 連続バイオリアクター最適化のための基礎的研究

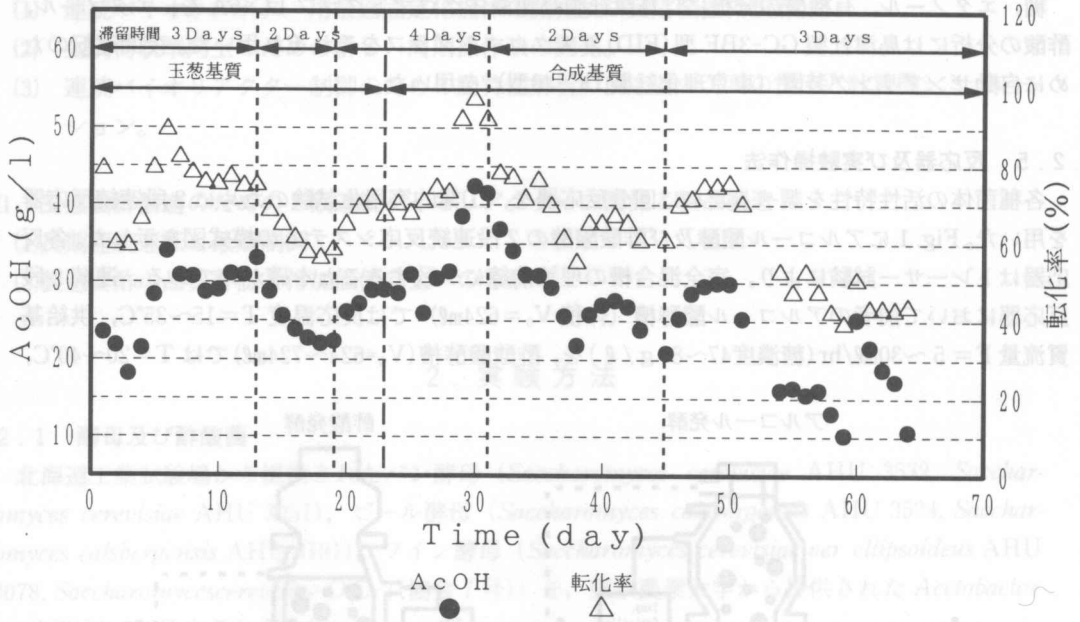


Fig. 2 アルギン酸ゲル長期酢酸連続発酵 (Temp. = 30°C)
リアクター体積 724ml

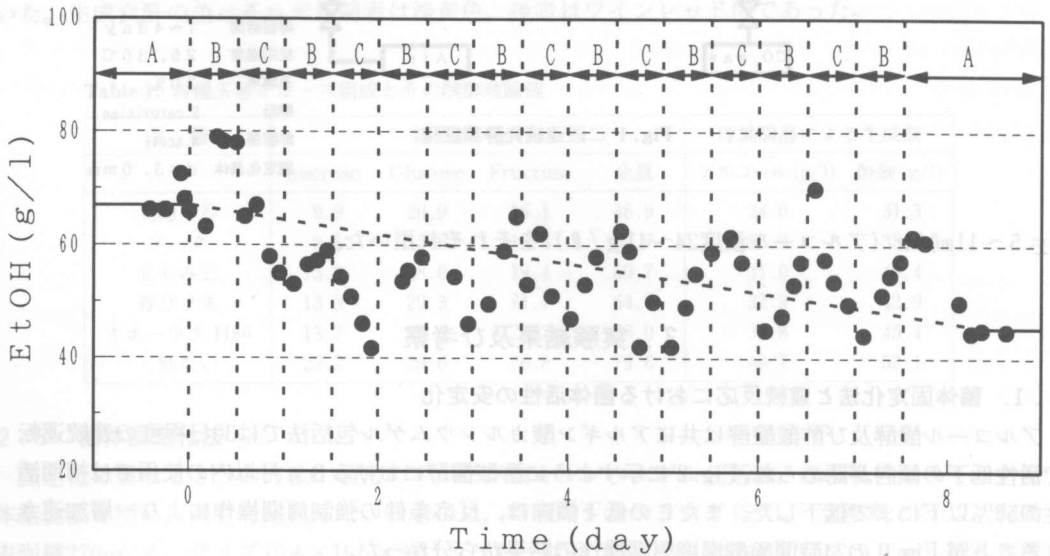


Fig. 3 24hr 周期による醱酵温度周期操作
流量 = 15ml/hr
温度範囲 : 15~35°C

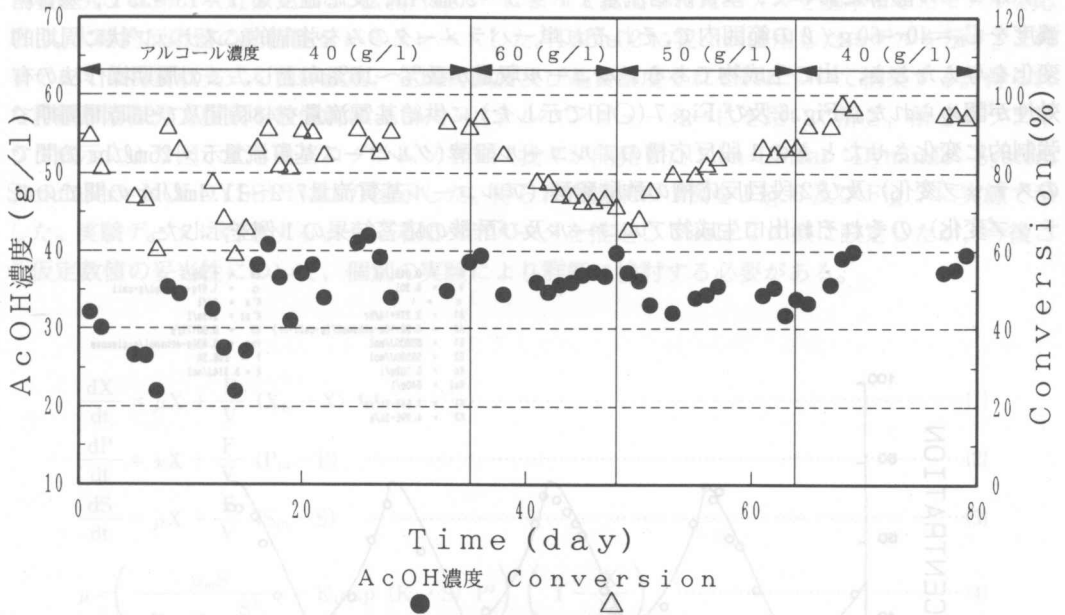


Fig. 4 酢酸菌担持シラリングによる長期発酵
リアクター体積 685ml Temp. 30°C

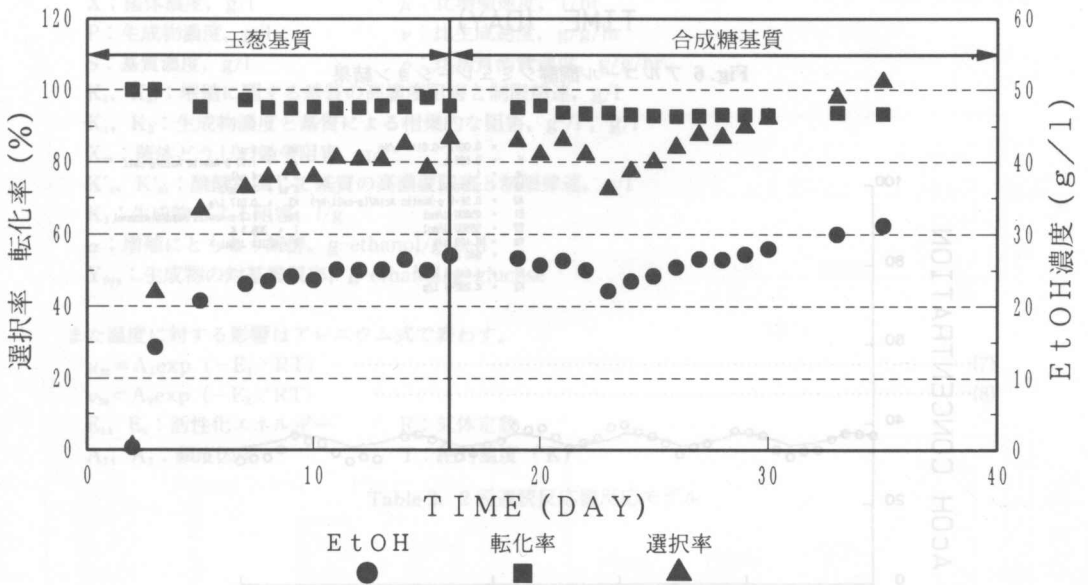


Fig. 5 玉葱アルコール醱酵 滞留時間 48hr
酵母担持セラミックスビーズ使用バイオリアクター
リアクター体積 1160ml

3.2 反応条件の強制周期操作による収率向上

アルコール発酵において、基質供給流量を $F = 5 \sim 25 \text{ ml/hr}$ 、反応温度を $T = 15 \sim 35^\circ\text{C}$ 、基質糖濃度を $C_0 = 40 \sim 60 \text{ g/l}$ の範囲内で、それぞれ単一パラメータのみを強制的にステップ状に周期的変化を与えたとき、出口生成物であるアルコール収量が数%~16%向上し、この周期操作法の有効性が認められた。Fig. 6 及び Fig. 7 (○印で示した) に供給基質流量を48時間及び96時間周期で強制的に変化させたときの1段反応槽のアルコール発酵(グルコース基質流量 $5 \sim 25 \text{ ml/hr}$ の間でのステップ変化) 及び2段目反応槽の酢酸発酵(アルコール基質流量 $7.2 \sim 11.4 \text{ ml/hr}$ の間でのステップ変化) のそれぞれ出口生成物アルコール及び酢酸の応答結果の1例を示した。

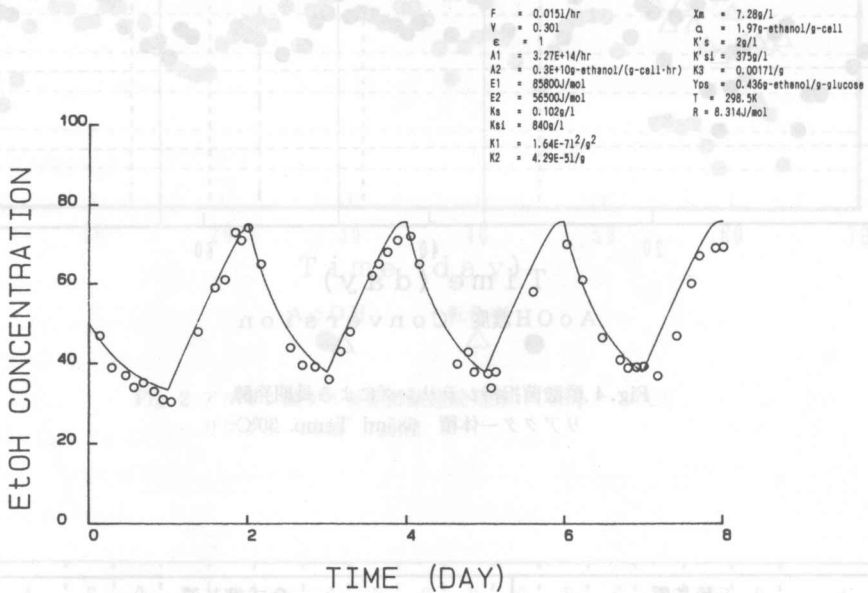


Fig. 6 アルコール発酵シミュレーション結果

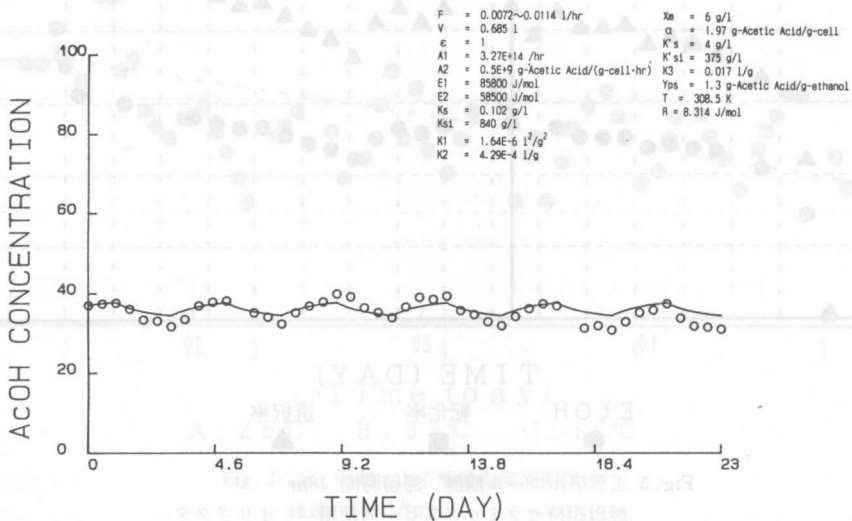


Fig. 7 酢酸発酵シミュレーション結果

3.3 2段連続反応器動特性の計算機シミュレーション

本研究では第一次近似として、松浦一雄¹⁾によって提出されたモデルを基本としたモデルを応用し、大略的反応器の動特性をシミュレートした。Table. 2に我々が使用したモデルを示す。このモデルでは物質収支を菌体濃度、生成物濃度及び基質濃度それぞれについて構築する。得られた非線形常微分方程式を数値解によりパーソナルコンピューターにを用いて解き、解をグラフィック表示により図示できるプログラムソフト（我々が開発した Non-Linear Dynamic System Simulater = NOLDYSS²⁾により図示した。得られた結果の1例を Fig. 6 及び Fig. 7 に実線で示した。実験データに合致するように未知パラメータを推定し Table. 3 の様に設定したが、今後この仮定数値の妥当性について、個別の実験により詳細に検討する必要がある。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \frac{F}{V} (X_{in} - X) \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\frac{dP}{dt} = \nu X + \frac{F}{V} (P_{in} - P) \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$\frac{dS}{dt} = \rho X + \frac{F}{V} (S_{in} - S) \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$\mu = \left(\frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_{s1}}} - K_1 \exp(K_2 \cdot S) P^2 \right) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\nu = \alpha \mu + \frac{\nu_m S}{K'_s + S + \frac{S^2}{K'_{s1}}} \exp(-K_3 \cdot P) \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$\rho = \frac{-\nu}{Y_{p/s}} \quad \dots\dots\dots(6)$$

X : 菌体濃度, g/l

μ : 比増殖速度, 1/hr

P : 生成物濃度, g/l

ν : 比生成速度, g/g/hr

S : 基質濃度, g/l

ρ : 比基質消費速度, g/g/hr

K_s, K_{s1} : 増殖に関する基質の高濃度阻害と制限律速, g/l

K_1, K_2 : 生成物濃度と基質による相乗的な阻害, $g^2/l^2, g/l$

X_m : 菌体どうしの競争阻害, g/l

K'_s, K'_{s1} : 醗酵に関して基質の高濃度阻害と制限律速, g/l

K_3 : 生成物による阻害, 1/g

α : 増殖にともなう醗酵, g-ethanol/g-cell

$Y_{p/s}$: 生成物の対基質収率, g-ethanol/g-glucose

また温度に対する影響はアレニウム式で表わす。

$$\mu_m = A_1 \exp(-E_1/RT) \quad \dots\dots\dots(7)$$

$$\nu_m = A_2 \exp(-E_2/RT) \quad \dots\dots\dots(8)$$

E_1, E_2 : 活性化エネルギー

R : 気体定数

A_1, A_2 : 頻度因子

T : 絶対温度 (°K)

Table 2. 2段連続反応器反応モデル

Table 3. 各パラメーター値

| | アルコール醱酵 | 酢酸醱酵 |
|--------------------------------------|----------|----------|
| A_1 /hr | 3.27E+14 | 3.27E+14 |
| A_2 g-product/ (g-cell · hr) | 0.30E+10 | 0.50E+9 |
| E_1 J/mol | 85800 | 85800 |
| E_2 J/mol | 56500 | 58500 |
| K_s g/l | 0.102 | 0.102 |
| K_{s1} g/l | 840 | 840 |
| K_1 l ² /g ² | 1.64E-7 | 1.64E-6 |
| K_2 l/g | 4.29E-5 | 4.29E-4 |
| X_m g/l | 7.28 | 6.0 |
| α g-product/g-cell | 1.97 | 1.97 |
| K'_s g/l | 2.0 | 4.0 |
| K'_{s1} g/l | 375 | 375 |
| K_3 l/g | 0.0017 | 0.017 |
| Y_{ps} g-product/g-substrate | 0.436 | 1.30 |

3.4 地域住民のアンケート調査による評価

本研究で生成された実験室レベルでの試作品そのままの玉葱酢について、オホーツク地域住民49人に対して試飲してもらい品質評価アンケートを網走支庁の手助けにより行った。調査結果の1例を Fig.8に示した。

市販食酢との比較においては、色は赤玉葱を使用した製品（ワインレッド）ということもあって、80%以上の人が濃い色であるとしている。なおについては、玉葱独特の臭い（タマネギスープの臭いに似た）から「きつい」とする人が80%弱居り、味は60%の人が濃いとしている。一方調味料としての評価は「おいしい」と「ふつう」を合わせて60%おり、25%の人が「おいしく

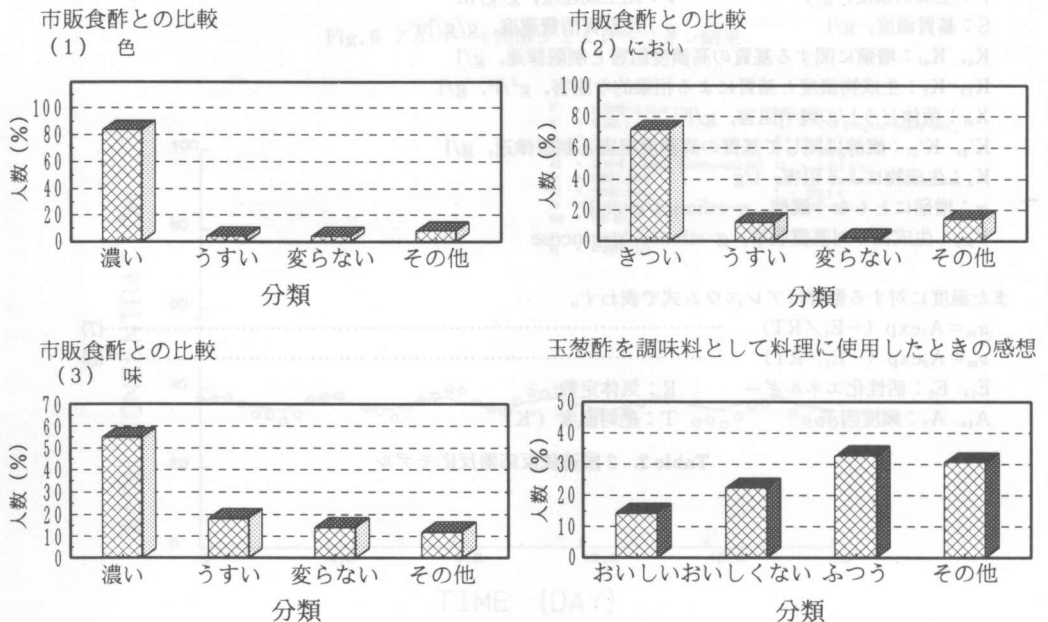


Fig.8 アンケート調査の結果と解析

ない」としている。これは「味が濃い」、「臭いがきつい」と連動していて、人によっての好みに関係する結果であると思われる。将来的製品開発として、どのような調味料としての可能性があるかとの問いには、60%の人がドレッシングとしている。これら味、臭い、などの問題については、スパイスなどモディファイによって、「オニオンドレッシング」として野菜サラダ、ポテトサラダ用に商品化出来ると思われる。

4. 結 言

4-1. 連続バイオリアクター最適化のための基礎データの集積

(1) 多孔性セラミック担体固定化菌による反応活性の安定化。

SiO₂系多孔性セラミック担体を用いることにより完全混合槽型2段連続反応器の3ヵ月以上の安定使用が可能であることを見出した。

(2) 2段連続反応器の収率向上のために、反応条件である温度及び供給基質流量の強制周期操作法を適用し、数%~16%の向上が認められた。

(3) 連続反応器制御のための第1次近似数学モデルを提出し、その詳細なパラメータの評価が出来れば使用可能であることが示された。

4-2. 2段連続バイオリアクターによる玉葱食酢の製造

(1) 生産性評価

研究室レベルにおいて2段連続醗酵槽（アルコール及び酢酸醗酵それぞれ容積602及び685ml）で202ml/日の食酢（酢酸4%強）が生産できることが分かった。

(2) 品質評価

市民によるアンケート調査により、赤玉葱酢は「ワインレッド」であり、風味共に60%の良好の評価を得、オニオンドレッシングなどの商品としての可能性が示された。

5. 謝 辞

本研究は、文部省特別研究費及び北海道研究開発支援事業研究費により遂行された。ここに謝意を表します。

6. 参考文献

- (1) 松浦一雄, 広常正人, 仲田富士男, 浜地正昭 「清酒の連続醗酵に関する動力学的研究」 醗酵工学会 69, 第5号, 345-354 (1991)
- (2) 葛西篤史 「複合経路反応速度面の計算機シミュレーション」 卒業論文 (1993)
- (3) 野白, 小崎, 好井 「醸造学」 講談社(1982)
- (4) 千畑一郎 「固定化生体触媒」 講談社(1986)
- (5) 微生物研究法懇談会編 「微生物学実験法」 講談社(1982)
- (6) 「バイオサイエンス」 政府関係資料 P.46 (1991)
- (7) Dariushi Hekmat, Dieter Vortmeyer, Measurement, Control, and Modeling of Submerged Acetic Acid Fermentation., Journal of Fermentation and Bioengineering 73, No.1, 26-30 (1992)
- (8) Yong Soo Park, Hisao Ohtake, Masahiro Tukaya, Hajime Okumula, Yoshiya Kawamura, Kiyosi Toda, Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentrations on Acetic Acid Production in Continuous Culture of *Acetobacter aceti*., Journal of Fermentation and Bioengineering 68, No.2, 96-101 (1989)