包括固定化酵母を用いた繰り返し回分発酵による 発酵風味液の生産[†]

玉井正弘*・三浦芳助**・丸本 進***

Production of Fermented Flavored Liquid by Repeated Batch Fermentation Using Immobilized Yeast Cells

(Studies on the Manufacturing Technology of Bread Part III)

Masahiro TAMAI*, Yoshisuke MIURA** and Susumu MARUMOTO***

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

** Department of Environmental Science, Faculty for Human Development,
Hiroshima Jogakuin University, 4-13-1 Ushita Higashi,
Higashi-ku, Hiroshima-shi, Hiroshima 732

*** Research Center, Takaki Bakery Co., Ltd., 598-2 Sono, Hatano-shi, Kanagawa 257

To efficiently produce a fermented flavored liquid for improving the taste of bread, we studied repeated batch fermentation in a bioreactor with the use of immobilized yeast cells. By using the bioreactor, a fermented flavored liquid containing about 5% (w/v) ethanol could be constantly produced. However, the bacterial count in the fermented flavored liquid gradually increased as the batch fermentation was repeated and reached 10^7 CFU/ml on the day 12. The growth of the bacteria separated from the fermented flavored liquid could be stopped at a lactic acid concentration of 0.25% (w/v). Lactic acid at this level did not affect the growth of the test yeast. When 0.4% (w/v) of lactic acid was added at the initiation of the culture in the repeated batch fermentation, the bacterial count in the fermented flavored liquid rapidly decreased and reached almost 0. An increase in the bacterial count could be inhibited by subsequently adding 0.2% (w/v) of lactic acid. When the addition of lactic acid was ceased, there was observed a tendency toward an increase in the bacterial count. After storing at 10°C for 16 days, the immobilized yeast cells enabled the production of the fermented flavored liquid similar to the one before storing. Regarding the major flavoring components in the fermented flavored liquid, the concentrations of ethyl acetate, isoamyl alcohol and isobutyl alcohol remained relatively constant, while organic acid concentrations considerably varied.

(Received Jan. 20, 1997 ; Accepted Apr. 12, 1997)

現在、国内で行われているパン製造法の多くには、その製造工程にパン生地が発酵工程を有している。パン生地の発酵工程の重要性については田中ら¹⁾が述べている

が、この目的の1つは、発酵に関与する微生物・酵素による香味及び香味前駆物質の生産と蓄積である。しかしながら、発酵のための時間は、中種法で4時間、スト

[†] パンの製造技術に関する研究 (第3報) (前報, 文献¹⁾)

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

** 広島女学院大学生生活科学部 (〒732 広島県広島市東区牛田東 4 丁目 13-1)

*** 株式会社タカキベーカリー中央研究所 (〒257 神奈川県秦野市曽野 598-2)

レート法で2.5時間程度と酒類等の他の酵母を用いた発酵に比較して短く、香味に関与する物質の生産と蓄積は不十分である。発酵時間の延長や添加酵母量の増加等によって、香味に関与する物質の種類と生産量の増加も望めるが、製造時間の延長によって生産効率の低下を招くとともに、ガス発生による生地膨張や生地熟成への影響によりパン本来の品質の低下を招く可能性がある。

一方、現在、発酵工程に使用しているパン酵母は、生地の膨張を主目的としているために、酒類等の製造に用いられている他の醸造用酵母に比較して生地中でのガス発生量は大きい。香味に関与する物質の種類と生産量は少ない。これらの要因により、市販されているパンの香味はそれほど高くなく、より香味に富んだパンの製造が望まれ、このための検討が行われている^{2)~4)}。

著者等はパンの香味の改良を目的として、生地中への発酵風味液の添加に注目し、第1報において酵母を用いて生産した発酵風味液を生地中に添加してパンを製造し、官能評価により風味液の生産に使用する酵母として協会9号酵母を選定し、無添加のパンよりも香ばしく、マイルドな香りが強調されて嗜好性の向上することを報告した⁵⁾⁶⁾。現在、香味の改善を目的とした風味液は、市販されているが使用までに日数を要した場合、その品質が変化する可能性もあるため、できるだけパン工場内で製造することが望ましい。また、すでに報告したように通常の回分発酵による風味液の生産には約65時間を要し、生産効率の低いことが認められた⁵⁾⁶⁾。ここで、酵母発酵液の効率的生産には固定化酵母の適用が有利であり、その報告も多く^{7)~11)}、著者等も米酢原料用のエタノール発酵液を固定化酵母により効率良く生産できることを報告した¹²⁾。

そこで、本報ではパンの風味を改善するための発酵風味液の効率的生産を目的として、アルギン酸カルシウム包括固定化酵母を用いたバイオリアクターによる繰り返し回分発酵について検討した結果について報告する。

実験方法

1. 発酵風味液の生産

(1) 供試菌株

(財)日本醸造協会保存菌株の協会9号酵母を用いた。

(2) 培地組成

粉末麴((株)徳島精工製、粉末乾燥麴1-70)を45g、米粉((株)キッコーマン製、パフゲンC-1)を105g及び水を850mlの割合で配合したものを基本培地とした。改変培地は、粉末麴15g、米粉30g、グルコース90g及

び水870mlの割合で配合したものを用いた。

(3) 固定化酵母の調製

ビーズ状のアルギン酸カルシウム包括固定化酵母は、既報¹²⁾と同様の方法で調製した。

(4) 培養方法

全容量3lの円筒流動層型のリアクターに調整した固定化増殖酵母ゲル200gと所定の基本及び改変培地1lを入れ、20及び15℃で培養した。培養開始後、24時間で培養を終了し、リアクター本体下部に設置したバルブを開いて発酵風味液を抜き取った。この時、リアクターの底部に、1mm間隔の金網を設置することにより固定化酵母ゲルをリアクター内に残存させた。発酵風味液を抜き取った後、直ちに新鮮培地1lを入れ新たな回分培養を開始し、24時間毎の回分培養を繰り返した。

(5) 分析

培養液中のグルコースは、グルコースCⅡテストワコー((株)和光純薬工業)を用いて測定し、エタノール、イソアミルアルコール、イソブチルアルコール及び酢酸エチルは、ガスクロマトグラフ¹³⁾で測定した。有機酸は、高速液体クロマトグラフ((株)日立製作所、充填剤:HITACHI-GEL 2618)で分離し、プロモチモールブルー緩衝液と混合した後に検出器((株)日立製作所)で測定した。培養液中の細菌数は、ナイスタチンとシクロヘキシイミドを50mg/lを添加した標準寒天培地(日水製薬)を用いた混釈培養法(培養温度及び時間:35℃, 72h)により測定した。

2. 培養液中の汚染細菌

試験管に入れた乳酸濃度を0~3%(w/v)に調製した基本培地の組成の糖化上清9.8mlに培養液及び乾燥麴より単離した菌株の前培養液を0.2ml接種し、30℃で穏やかに振盪培養した。経時的に吸光度(610nm)を測定し、汚染細菌と供試酵母の増殖を測定した。

実験結果及び考察

1. 培地組成と培養温度の影響

発酵生産物は、培養条件により影響を受ける。そこで、発酵風味液の品質に与える培地組成と培養温度の影響を調べるために、基本及び改変培地の2種類と培養温度を15及び20℃とした培養条件で、繰り返し回分培養を行った。

基本培地及び20℃で行った繰り返し回分培養では、5日目までゲル内の酵母が十分に増殖していないために、24時間後の生成エタノール濃度は低かったが、5回目以降は約5%(w/v)となり、以後安定に発酵風味液を生産

できた。次いで、改変培地を用いた20℃での回分培養でも、約5% (w/v) のエタノール濃度の発酵風味液を安定に生産できた。15℃で基本培地と改変培地を用いて繰り返し回分培養を行った結果、生成エタノール濃度は約4% (w/v) と低くなった。生成エタノール濃度が20℃の場合と比較して低い値となった原因は、改変培地での培養において残存グルコース濃度が3% (w/v) と高い値であることから、培養温度の低下による酵母のエタノール生成活性の低下と考えられる。培養温度を低下させた場合には、バイオリクター中の固定化酵母ゲル量を増加させる必要がある¹²⁾。

以上4つの条件で生産した発酵風味液を-20℃で凍結保存し、これを用いたパンを製造して官能評価を行った。その結果、20℃での基本及び改変培地ではパネリスト32人中24人が基本培地で生産した発酵風味液を添加して製造したパンを好ましいと回答した。15℃の場合でも基本培地を32人中23人が好ましいと回答した。さらに、基本培地を用いた15と20℃での2回の官能評価では、いずれも好ましいと回答したパネリスト数はほぼ同数であった。培地組成に関しては改変培地よりも米粉及び粉末麴含量の高い基本培地の方が嗜好性が高く、培養温度に関しては15及び20℃では有意差は認められなかった⁶⁾¹⁴⁾。

また、20℃での基本及び改変培地で生産した発酵風味液を添加して製造したパンと無添加のパン(クラム部位)中のガスクロマトグラフ質量分析を行い、41の香気成分を分離・同定した。いずれのパンでもイソアミルアルコールの組成比が最も高く、次いでイソブチルアルコール、エタノールの順であった。基本培地、改変培地及び無添加でのイソアミルアルコール組成比(%)は、各40.8、42.0及び40.0とほとんど差は無かったが、イソブチルアルコールとエタノールは、11.5、11.9及び14.1と4.6、5.9及び11.4であり嗜好性の高いものほど低くなった。分離された香気成分の数(組成比として0.2%以上)は、それぞれ35、26及び22と嗜好性の高いものほど多くなった⁶⁾¹⁴⁾。

2. 連続生産時の風味液の性状

以上のことより、風味液の培地として基本培地を用い、培養温度は冷却コストの面から20℃で行うこととし、24時間毎の繰り返し回分発酵を行った。結果をFig. 1に示した。図中のシンボルは、いずれも1回の回分培養終了時の値である。培養を重ねることにより、エタノール濃度は次第に増加し、グルコース濃度は低下した。そして、7日目以降安定したエタノール、グルコース

Fig. 1 Progress of repeated batch fermentation using immobilized yeast cells

○, ethanol; △, glucose; ▲, bacteria cell counts; □, pH; ■, ethyl acetate; ▢, isoamyl alcohol; ▽, isobutyl alcohol; ⊙, citric acid; ▼, tartaric acid; □, malic acid; ×, succinic acid; ◆, acetic acid; ●, lactic acid.

濃度となり、24日目まで約5% (w/v) のエタノールと約0.8% (w/v) のグルコース濃度の風味液を安定に生産できた。この時、風味液中の細菌数は、5回目までは 10^2 (CFU/ml) 以下であったが、この後急激に増加し、12日目以降ではほとんどの風味液中の細菌数は 10^7 (CFU/ml) 以上となった。細菌数の増大は、風味液の品質の低下を招く恐れもあり、細菌数の増加を抑制するための対策を検討する必要がある。

また、前報⁶⁾¹⁴⁾で報告したパン中の香気成分としてその組成比の高かったイソアミルアルコール、イソブチルアルコール及び酢酸エチル濃度は、3～5日目以降、それぞれ、ほぼ110、30及び40 mg/lで安定していた。

有機酸のうち、酒石酸は、0から220 mg/lと大きく変動した。酢酸は、あまり変動せずに23回の平均で約100 mg/lであった。クエン酸は、最初は500 mg/l程度で

あったが、7日目まで次第に低下し、この後約140 mg/lで安定した。コハク酸は、7日目まで次第に増加し、この後約380 mg/lで安定した。リンゴ酸は、培養回数を重ねるにつれて90から300 mg/lへと次第に増加した。乳酸は、7回目までは低い値であったが、この後急激に増加し、約800 mg/lに達した。

3. 固定化酵母の保存

10℃で16日間保存した固定化酵母を用いて、24時間ごとの繰り返し回分発酵を40日目より再開した (Fig. 1)。保存した固定化酵母は、1回目よりグルコースをほぼ完全に消費し、約5% (w/v) のエタノールを生産し、この後も安定にエタノールを生産した。この間、細菌数は、 10^7 (CFU/ml) の高い値であった。香気成分と有機酸は、保存前とほぼ同程度の濃度を安定に生成した。このことは、風味液が不要の時に固定化酵母を低温で保存しておくことにより、必要に応じていつでも風味液が生産可能となり、長期連続生産にとって大変有利である。

4. 回分培養の経時変化

繰り返し回分培養において1回の回分培養がどのような経時変化をとるのかを調べた。繰り返し回分培養の48日目での結果をFig. 2に示した。

新たな回分培養開始直後より、エタノールを速やかに生成したが、時間の経過とともに残存グルコース濃度の低下により、次第にエタノールの生成速度は低下した。有機酸のうち、酒石酸は検出されず、クエン酸と酢酸は培養期間中ほとんど変化しなかった。リンゴ酸、コハク酸と乳酸は培養開始後16時間までは増加していったが、その後はあまり変化しなくなった。香気成分は、24時間以降も次第に増加していった。このことより、香気成分量は培養時間の経過とともに増加するが、有機酸量は一定時間以後は変化しないことが認められた。

5. 風味液の汚染細菌の増殖抑制

12日目以降、培養液中に多量の細菌が検出された。発酵風味液の安定生産のためにも細菌数の増加の抑制が必要である。そこで、生地発酵には乳酸菌も大きく関与し、パンの物性や香味形成に不可欠の存在であり¹⁾、将来において発酵風味液中の香気成分の増強並びに多様化等を考慮して酵母に加えて乳酸菌の利用を目指しているために、乳酸による抑制を検討した。

米粉及び乾燥麴中の一般生菌数は、それぞれ0及び200 (CFU/g) であったので、乾燥麴と風味液から単離した菌株及び供試酵母について、乳酸濃度を0~3.0% (w/v) での増殖の経時変化を測定し、代表的な結果をFig. 3に示した。培養液から分離した4菌株は乳酸濃度が

Fig. 2 Typical progress of batch fermentation using immobilized yeast cells (The 48 days in a repeated batch fermentation series.)

Symbols are the same as those in Fig. 1.

0.25% (w/v) 以上で増殖を完全に抑制でき、乾燥麴から分離した2菌株は増殖しなかった。一方、供試酵母は、乳酸濃度の増加につれて増殖速度は低下したが、汚染細菌の増殖を完全に抑制する乳酸濃度の0.25% (w/v) ではその増殖にはあまり影響を与えなかった。

そこで、培養液中の添加乳酸濃度を50日目より、0.4% (w/v)、60日目より0.2% (w/v) 乳酸を添加し、64日目より乳酸の添加を停止した (Fig. 1)。その結果、生成エタノール濃度は0.4% (w/v) で4% (w/v) に低下したが、0.2% (w/v) で4.7% (w/v)、無添加で約5.9% (w/v) と乳酸の添加量を減少することにより次第に増加した。これは、各乳酸添加区において、米でんぷんから生成したグルコースをほぼ完全に消費し、pHが3.6から3.1に低下していることより、乾燥麴由来のでん粉分解に関与する酵素の活性が低下したためと考えられる。細菌数は、0.4% (w/v) 添加区において培養を重ねるにつれて次第に減少し、60日目 (乳酸添加回分培養の10回目) にはほとんど2 (CFU/ml) に低下した。0.2% (w/v) 添加区では、2 (CFU/ml) 程度であった。乳酸を添加しないと培養を重ねるにつれて、細菌数は増加する傾向となった。香気成分は、あまり変動は無かった。有

Fig. 3 Effect of lactic acid concentration on growth

Initial concentration (% (w/v)); ○, 0; △, 0.25; □, 0.5; ▽, 0.75; ◇, 1; ●, 1.25; ▲, 1.5; ■, 1.75; ▼, 2; ◆, 3.

機酸では、乳酸が添加量に応じて増加したが、添加を停止すると 100 mg/l 程度に低下し、風味液中の乳酸は汚染細菌により生産されたことが認められた。また、コハク酸が増加したが他はあまり変動しなかった。

以上のことより、乳酸を培地中に 0.2% (w/v) 程度添加することにより、汚染細菌の増殖を抑制できることが認められた。

6. 生成エタノールと香気成分及び有機酸との関係

バイオリクターにより生産した発酵風味液の品質を評価するために、1) 汚染細菌の存在する場合、2) 乳酸を添加した場合と 3) 乳酸を添加せずに汚染細菌数の少ない場合の 3 段階での生成エタノールと香気成分及び有

機酸濃度の関係について検討した。香気成分の結果を Fig. 4, 有機酸の結果を Fig. 5 に示した。

酢酸エチルは、1) の場合では、生成エタノールとは関係無く 30~50 mg/l の間で変動し、2) の場合では、生成エタノールの増加につれて増加し、3) の場合では、生成エタノールとは関係無くほぼ 50 mg/l 付近で安定していた。イソブチルアルコールは、1) の場合では、生成エタノールの増加につれて漸増し、2) の場合では、生成エタノールの増加につれて漸減する傾向であった。3) の場合では、生成エタノールの増加により急激に増加したが、その値は 22~75 mg/l の間で大きく変動した。イソアミルアルコールは、1) 及び 2) の場合は、生成エタノールに関係無くほぼ 100 及び 90 mg/l 前後で安定し

Fig. 4 Relationship between produced ethanol concentration and ethyl acetate, isoamyl alcohol and isobutyl alcohol

○, the period of high living cell count (6 to 48 days in Fig. 1); △, addition of lactic acid (50 to 64 days in Fig. 1); □, no addition of lactic acid (64 to 74 days in Fig. 1).

Fig. 5 Relationship between produced ethanol concentration and organic acids

Symbols are the same as those in Fig. 4.

ていた。3) の場合では、44~85 mg/l の間で変動した。全体の傾向として、2) の乳酸添加を行った場合の方が発酵風味液中の香り成分濃度が安定する傾向にあった。

乳酸を除く5つの有機酸は、クエン酸では60~180 mg/l、酒石酸では0~300 mg/l、コハク酸では330~650 mg/l、リンゴ酸では177~456 mg/l、酢酸では15~132 mg/lと何れも大きく変動した。生成した有機酸は、Fig. 2 からエタノール濃度が4% (w/v) 以上では変化しなくなるにより、生成エタノールとは無関係に変動すると考えられる。有機酸濃度がこのように大きく変動する原因は不明であるが、乳酸添加区の方が比較の変動の幅が小さくなった。

以上のことより、アルギン酸カルシウム包括固定化酵母を用いたバイオリクターによる繰り返し回分発酵は、パンの風味改善に使用する発酵風味液を効率的に生産できることが認められた。

要 約

パンの風味を改善するための発酵風味液の効率的生産を目的として、アルギン酸カルシウム包括固定化酵母を用いたバイオリクターによる繰り返し回分発酵について検討した。

(1) 培養温度の低下により回分培養終了時のエタノール濃度は低下したが、2つの培地組成及び培養温度でも安定に発酵風味液を生産できた。

(2) 発酵風味液中の細菌数は、繰り返し回分培養の回数を重ねるにつれて次第に増加し、12日目以降は 10^7 (CFU/ml) に達した。

(3) 固定化酵母を10℃で16日間保存した後も、保存前と同様に発酵風味液の生産が可能であった。

(4) 風味液中より分離した細菌は、0.25% (w/v) の乳酸で増殖を停止できた。この乳酸濃度では供試酵母の増殖には影響を与えなかった。

(5) 繰り返し回分発酵において培養開始時に乳酸を0.4% (w/v) 添加することにより、風味液中の細菌数は急速に低下し、ほぼ0になった。その後、0.2% (w/v) 添加することにより細菌数の増加を抑制することができた。乳酸の添加を停止すると細菌数は増加する傾向にあった。

(6) 風味液中の香り成分濃度は、比較的安定していたが、有機酸濃度はかなり変動した。

文 献

- 1) 田中康夫・松本 博編：製パンプロセスの科学，光琳 (1991)。
- 2) 嶋田昇二：イースト技報，51，35 (1981)。
- 3) 弘中泰雅：日食工誌，32，486 (1985)。
- 4) 弘中泰雅：日食工誌，32，592 (1985)。
- 5) 三浦芳助・玉井正弘：広島女学院大学生生活科学部紀要，2，91 (1995)。
- 6) 三浦芳助・玉井正弘：New Food Industry，38，No. 12，29 (1996)。
- 7) NISHIZAWA, Y., MITANI, T., TAMAI, M. and NAGAI, S.: *J. Ferment. Technol.*, 61, 599 (1983)。
- 8) MITANI, Y., NISHIZAWA, Y. and NAGAI, S.: *J. Ferment. Technol.*, 62, 249 (1984)。
- 9) MARGARITIS, A. and WILKE, C.R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 727 (1978)。
- 10) WADA, M., KATO, J. and CHIBATA, I.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 275 (1984)。
- 11) NAGASHIMA, M., AZUMA, M., NOGUCHI, S., INOZUKA, K. and SAMEJIMA, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 992 (1980)。

-
- 12) 玉井正弘・門 隆興・村山徹雄：発酵工学，68，465 (1990)
- 13) 玉井正弘・丸子 修・門 隆興：食科工，44，119 (1997)
- 14) 三浦芳助・玉井正弘・丸本 進：広島女学院大学生活科学部紀要，3，135 (1996).
(平成 9 年 1 月 20 日受付，平成 9 年 4 月 12 日受理)
-