

通気攪拌培養による高濃度酢酸醱酵

朝 井 勇 宣・高 井 政 民 (東京大学農学部農芸化学教室)

緒 言

必要な栄養源を含む醪中のアルコールから酢酸菌によつて比較的高濃度の酢酸醱酵を行おうとする試みは、J.L. SCHIMWELL ら¹⁾が普通の速酢法によつて最高12%の濃度のものを得た報告があり、又生成した酢酸を中和して更に高濃度のものを得ようとして、SILBERNAGEL²⁾は生成した酢酸を炭酸石灰で中和して酢酸の遊離分としての濃度が常に5%となるように調節しつつアルコールを添加し酢酸全濃度が16%になるまで醱酵を続け後石灰を除いて高濃度の酢酸液を得た。

一方、酢酸醱酵を液内通気攪拌によつて行おうとする研究は上記 J.L. SCHIMWELL¹⁾, O. HROMATAKA ら³⁾によつて実験室的規模の通気攪拌フエメンターに依つて行われ、主として醱酵速度の測定等が行われた他、実際にブドウ酒醪より高収率で酢酸を得ている。TH. MARKHOF ら⁴⁾はワールドホッフ型のジャーフエメンターを用いて同様の実験を行なっている。しかしこの方法で高濃度の酢酸醱酵を行おうとする試みはない。著者らは液内通気攪拌に依る酢酸醱酵に於いてアルコールより酢酸を高濃度に得ようとする実験を行い次の様な結果を得たので報告する。

1. 使用菌株の撰択

① 供試菌株 試用に供した菌株は東京大学応用微生物研究所保管の中から分譲された次の12種である。

	保管番号
<i>Acetocacter rancens</i> Beijerinck NRRL B-65	A4
<i>Acetobacter ascendens</i> (HENNEBERG) BERGEY et al. NRRL B-56	A10
<i>Acetobacter acetosum</i> (HENNEBERG) BERGEY et al. NRRL B-468	A8
<i>Acetobacter aceti</i> (KÜTZ) BEIJERINCK ATCC 8303	A11
<i>Acetobacter aceti</i> BROWN f. sp. <i>Prunitriflorae</i>	A37
* <i>Acetobacter acetosum</i> HENNEBERG	A19
* <i>Acetobacter ascendens</i> HENNEBERG var. I	A12
* <i>Acetobacter ascendens</i> HENNEBERG var. II	A13
* <i>Acetobacter acetosum</i> HENNEBERG* var. I	A14
* <i>Acetobacter acetosum</i> HENNEBERG var. II	A15
* <i>Acetobacter rancens</i> Beijerinck var. I	A17
* <i>Acetobacter aceti</i> BROWN var. I	A16

(*印は中壱研究所より分譲のもの)

以上の菌株の中から次の実験を行い供試菌の撰択を行つた。撰択の基準は次の如くである。

- (1) 静置培養により酢酸を高収率で生産し且香味よく透明度のよいもの。
- (2) 振盪培養により酢酸を高収率で生産し且香味よく透明度のよいもの。

② 静置培養試験 製パン用生イーストの10%抽出液にグルコース0.5%, エタノール約4%添加せる醪100ccを200cc容三角コルベン中に入れ、エタノール・炭酸カルシウム添加麴寒天斜面上30°C, 24時間培養した菌体を各一白金耳ずつ接種した後、27°Cの恒温室に一定期間培養したのについてその酸生成量、香味、透明度を観察した。

③ 振盪培養試験 ②で用いた醪中のアルコール濃度を5g/dlとして、500cc容振盪コルベン中60cc分注し、各菌を一白金耳ずつ接種後27°Cの恒温室中で振巾7cm, 回転数116r.p.m.の振盪機上で培養した。

エタノールの定量は、蒸溜は通常の方法⁵⁾で行つたが、酸化及び滴定は矢野⁶⁾による方法で行なつた。酸度は供試醱酵液の菌体を除いて蒸溜水で10倍に稀釈し、0.1N-NaOHで中和滴定し原醪の酸度(平均10cc⇌1cc of 0.1N-NaOH soln.)を差し引いた値で示した。

2. 使用培地の検討

(230)

(朝井, 高井) 通気攪拌培養による高濃度酢酸醱酵

Table 1. Acetification test by static cultures.
Initial alcohol contents. 3.9g/dl. 200cc
ERLENMEYER flask. 27°C.

Strain	Acid contents as AcOH g/dl		Turbidity*	Odor
	after 10days	after 14days		
A4	4.37	5.07	—	○
A8	2.09	2.30	+	○
A10	0.10	0.11	+	×
A11	4.53	4.44	+	○
A12	0.13	0.27	+	×
A13	0.87	0.65	—	×
A14	4.48	5.16	+	○
A15	4.84	5.04	—	○
A16	4.35	3.99	+	○
A17	3.39	2.86	+	×
A19	0.15	0.02	—	○
A37	0.35	1.36	+	×

* Observed after 10 mins operating by centrifugal settler with 3000r/m.

Table 2. Acetification test by shaking cultures
Initial alcohol contents : 4.9g/dl.

Strain	Acid contents as AcOH g/dl				Residual alcohol g/dl
	20hrs	42hrs	68.5hrs	110hrs	
A4	0.30	4.71	6.11	6.14	0.00
A8	0.01	—	0.06	0.06	4.63
A10	0.06	1.73	2.48	2.45	2.10
A11	—	0.01	—	0.02	4.52
A12	0.24	0.60	0.83	0.89	4.00
A13	0.01	0.03	0.03	0.00	4.73
A14	0.06	—	0.62	3.04	2.06
A15	0.48	2.63	2.59	2.51	2.02
A16	0.24	0.96	2.07	3.66	1.77
A17	0.06	0.06	—	0.03	4.55
A19	0.01	0.06	0.06	0.06	4.64
A37	0.01	0.01	0.03	0.03	4.61

前記に依る実験の結果A4の菌株が供試菌として最適である事が知れたので、この菌株を用いて今後の実験を進める事にした。培地組成の差による実験誤差を少なくする目的で比較的一定の組成のものが期待出来る次のような合成培地の使用を試みた。

A. Basal medium.* (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, Fe-SO₄·7H₂O 0.001%, MnSO₄·4H₂O 0.001%, NaCl 0.001%, Ethanol 5.00%, Glucose 0.50%.

* M.R. RAGHAVENDRA RAO et al.⁷⁾の提唱せる組成。

B. Vitamins medium.

A培地に C. RAINBOW ら^{8, 9)}の提唱する次のビタミン類を添加したもの。パントテン酸 67μg/dl, PABA 10 μg/dl, ニコチン酸 67μg/dl, サイアミン 67μg/dl, イノシトール 500μg/dl, ビオチン 0.33μg/dl, ナイアシン・アミド 83μg/dl.

C. Amino acids medium

B培地に更に次のアミノ酸を添加したもの。このアミノ酸類添加は B.S. TEPPER ら¹⁰⁾が提唱している。l-leucine 0.05g/dl, l-valine 0.05g/dl, dl-methionine 0.01g/dl, l-phenylalanine 0.01g/dl.

D₁. Peptone medium ペプトン 1%, エタノール 5.0%, グルコース 0.5%.

D₂. Peptone-vitamin medium B培地にペプトンを 1 g/dl 加えたもの。

実験は 500 cc 容振盪コルベン中培養液 60cc ずつ分注し、A4 菌—白金耳接種後、27°C の恒温室内で 116r/m, 振巾 7 cm の振盪機上で培養した。結果を Table 3 に示した。

Table 3. Acetification test with some synthetic media by shaking cultures.

Medium	Acid contents as AcOH g/dl				
	46hrs	72hrs	96hrs	120hrs	144hrs
A	0.40	0.45	0.40	0.43	0.51
B	0.40	0.50	0.73	0.92	1.38
C	0.32	0.40	0.68	0.79	1.22
D ₁	0.99	1.28	2.29	3.87	3.85
D ₂	3.89	5.55	5.55	5.55	—
Yeast ext.	4.79	6.15	6.19	6.17	—

この実験に依れば純合成培地では Vitamin medium で接種振盪後 144 時間後に漸く 1.38g/dl の酸度に到るに過ぎず本実験には使用出来ず、僅かにペプトンを加えた培地ではバースト抽出液に近い結果が得られるが、むしろ醱酵状態のすぐれているバースト抽出液の方が便利であると考えられる。

E. 酒粕抽出液

食酢製造に用いられている清酒搾粕抽出液に就て振盪培養実験を行つた。水分70%の清酒粕の10%抽出液にアルコールを加えてその濃度 5 g/dl とした醪を使用して酢酸醱酵試験を行つた。最初アルコール濃度は酒粕抽出液中4.83%, イースト抽出液中4.90%であつた。酒粕抽出液はグルコース無添加であつたが、醱酵速度及び酸生成量は全くイーストエキス糖添加液に於けると同様であつた。従つて実験上酒粕抽出液を使用すればイースト糖添加液と同じ結果が得られると期待出来る (Table 4)。

3. 酒精濃度の影響

イースト糖添加液中アルコール濃度 5, 6, 7, 8, 9, 10%にして調整した醪を使用し前述の方法で振盪培養を行なつた。その結果は Fig. I に示した。

4. 酢酸塩耐性試験

前の実験でアルコール濃度が約 5%を超えると悪影響があると考えられるので、本実験で目的とする高濃度醱酵を行なうには当然最初のアルコール濃度を低くして始めなければならない。従つて生成した酸は順次中和して行くと同時に feeding によつてアルコールを一定濃度以上にならぬようにしながら加えて行く方法が考えられる。中和剤としては苛性ソーダ、ソーダ灰、炭酸石灰などが考えられるが、之等の酢酸塩の影響を調べるため次の様な実験を行つた。前述のイースト抽出液醪中に醋酸ソーダ6.9%, 又は醋酸カルシウム6.6%を加え、アルコール濃度を 5%で振盪培養を行つた。総酸は硫酸酸性にして水蒸気蒸溜を行い NaOH 液で捕集して測定し、酢酸として計算した。醪の最初の pH は塩添加物が6.0無塩培地で5.8であつた。この結果は無塩培地では72時間で酢酸6.20%に達するに対して、Na 塩添加物では72時間で2.37%, 96時間で漸く2.92%に達するに過ぎず、Ca 塩では72時間で5.18%, 96時間で5.87%と、中和剤としては Na 化合物よりも Ca 化合物の方が遙かに秀れて居り、しかも殆んど醱酵に対して障害がないと思われる (Table 5)。

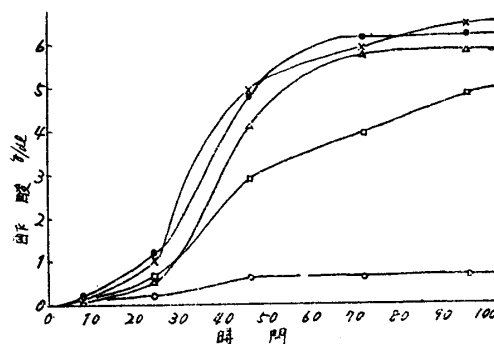
5. 中和振盪培養

Ca 塩に依つての障害は殆どない事が知れたので中和剤として炭酸石灰を用いて生成酸を中和する実験を次の様に行なつた。

① 炭酸石灰を添加して振盪培養

Table 4. Acetification test with Sake-lees extract and baker's yeast extract by shaking culture.

Medium	Acid content as AcOH g/dl				
	22hrs	40hrs	60hrs	80hrs	120hrs
Sake-lees A	0.75	4.62	5.88	6.15	6.19
B	0.33	4.73	6.03	6.18	6.15
Yeast ext.	0.30	4.71	5.91	6.19	6.15

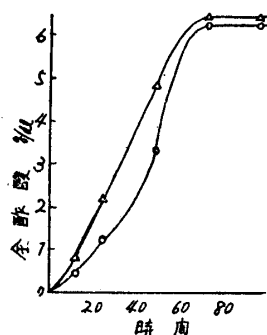


最初のアルコール濃度 g/dl
 —●—4.90, —×—6.03, —△—6.90,
 —□—7.87, —○—10.10

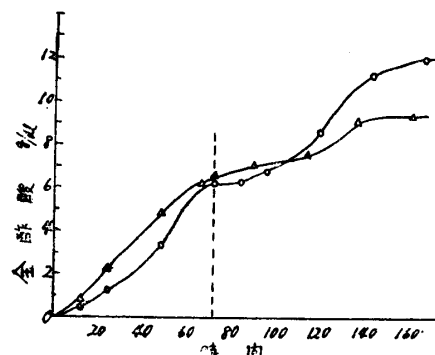
Fig I アルコール濃度の影響

Table 5. Acetification test with Na-acetate and Ca-acetate by shaking culture.

Acetate	Acid contents as AcOH g/dl				Total acid g/dl
	24hrs	48hrs	72hrs	96hrs	
Na-	0.00	0.61	2.37	2.92	8.13
Ca-	0.00	2.28	5.18	5.87	11.11
Non.	0.36	4.63	6.19	6.20	6.20



—○— CaCO₃ 添加せるもの
 —△— CaCO₃ 添加しないもの

Fig II CaCO₃ 添加の影響

—○— 最初から CaCO₃ 添加せるもの
 —△— 72時間後に CaCO₃ を添加せるもの

アルコールの添加は72時間目に行つた

Fig III 前中和, 後中和の影響

(232)

(朝井, 高井) 通気攪拌培養による高濃度酢酸醱酵

を行なったもの。10%イースト抽出液中アルコール含量5%とした醪に酢酸6 g/dlに相当する炭酸石灰を乾熱滅菌して添加して培養した結果を Fig.II に示した。

② 最初に炭酸石灰を添加した醱酵液にアルコールを補足するものと、培養後酢酸濃度がほぼ最高値に達してから炭酸石灰を添加、同時にアルコールを補足するものとの比較実験を行なった結果を Fig.III に示す。

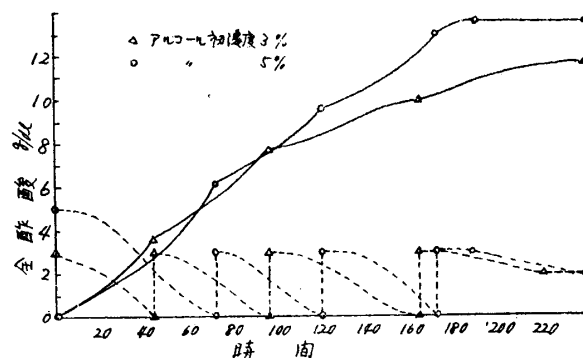
③ アルコールを補足する場合、最初から中和剤を加える方法がよい結果を得られるので炭酸石灰添加培養液に多段階にアルコールを feed して行く実験を行い、最初のアルコール濃度の影響も併せて調べた。イースト抽出液アルコール添加培養液に所定の炭酸石灰を加え、アルコール濃度を夫々3%, 5%として500cc容振盪コルベン中に60ccずつ分注し、同様な培養液で24 hrs 前培養した液3ccを加えて27°Cの恒温室中で振盪培養を行なった。総酸度が6%又は3.6%を超えるかアルコール濃度が0.3%以下になったのを、数本の併実験コルベンからサンプリングして確かめ、アルコールを3~5%, 炭酸石灰相当量を加えて培養を続け、この操作を数回繰返し結局アルコールの消費が見られなくなるまで行なった (Fig.IV)。

6. Jar fermenter に依る中和醱酵

振盪培養に依つて酢酸を中和しながら培養を続ける事に成功したので、之を通気攪拌培養法で行う目的で、実験室用20リットル jar fermenter によつて実験を行なった。イースト糖添加醪中アルコールを5 g/dlとし、乾熱滅菌した炭酸カルシウムを相当量加えて液量を10 lとして温度27°Cで培養を行なった。尚菌の接種は同様な培養液で24時間前培養した液500 ccを加えた。最初の期間に通気を行なうのはアルコールの損失が大きいのので、初めの8時間及び24時間は攪拌のみ行う実験も行なった。通気攪拌培養に於いて酸化醱酵の速度を支配すると思われる酸素溶解速度恒数 K_d を規定するファクターの中、同一フェーマンターでは通気量よりも攪拌回転数の変化の方が相当大きく影響する事が山田ら¹¹⁾に依り報告されて居り、一方に於て蒸発物質は攪拌よりも通気量によつて大きく逃げる事が予想されるので、実験は攪拌回転数を大きくして通気量なるべく小さくつけた。培養後約20時間でかなりの起泡があり、排気孔に接触する迄に至つたので消泡剤としてシリコンオイルKM60の10倍水溶液を使用して少量で充分その目的を達した。Fig.V に予備実験としての通気、攪拌の影響を示した。図中Nは攪拌回転数 (r/min), Vは通気量 (l/min) を示している。

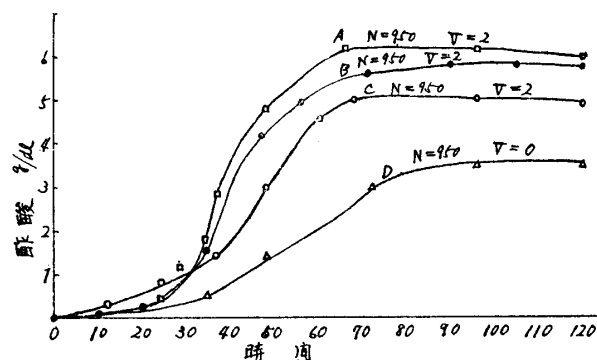
7. Jar fermenter による高濃度酢酸醱酵

前記 Jar fermenter にアルコール feeder 及び炭酸石灰泥 feeder を取付け、5%アルコール含有イースト抽出液10 l及び乾熱滅菌せる炭酸石灰相当量加え、27°Cに保温してから同様培養液で24時間振盪した前培養液を500cc加え、最初8時間通気を行わず、攪拌のみを行な



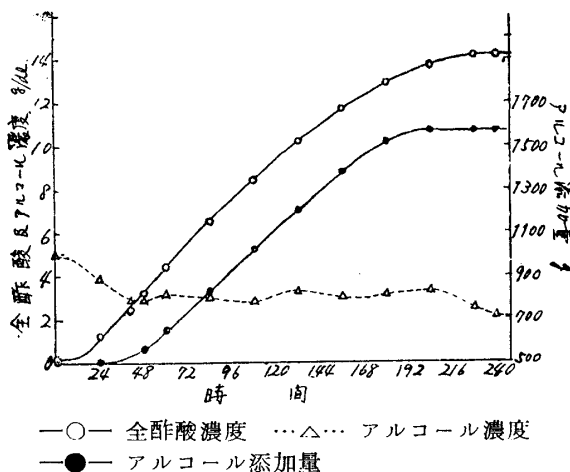
実線 酢酸濃度、破線 アルコール濃度

Fig. IV 多段仕込による振盪培養



A: 接種後8時間通気開始 B: 接種後24時間通気開始
C: 最初から通気 D: 通気行わず

Fig. V Jar fermenter に於ける通気の影響



—○— 全酢酸濃度 ...△... アルコール濃度

—●— アルコール添加量

Fig. VI Jar fermenter による中和培養

つた。通気量は 2 l/min, 攪拌回転数 950r/min であつた。アルコール濃度は最初 4.78g/dl で、48 時間後約 3 g/dl になつてからアルコールの feeding を始めた。最初の 80 時間は 10 時間約 100cc の割合で滴下添加し、醱酵液中のアルコール濃度を 2.8~3.25% の範囲に制御する事が出来た。後漸次滴下速度を落し最後は 10 時間に 40cc 位にまで低下せしめた。この調節によつて液中アルコール濃度を終始 3 % 附近に置いた。全アルコール feeding 量は約 1 kg であつた。炭酸石灰の投入は液中 pH が 5.0 に低下したのを見て随時添加し pH を 5.4~4.8 に保持するようにした。炭酸石灰の投入量は約 700g であつた。排気口は水冷凝縮器を取り付け凝縮分は fermenter に戻した。液量の変化は最初 10.7 l, 最後は 10.9 l で、濾過後の醱酵終了液は 10.1 l, 酢酸濃度 14.20g/dl, アルコール残留分 2.13 g/dl であつた。醱酵経過は Fig. VI に示した。

この実験に於ける収支表を次に示した。

最初のアルコール	500g
Feeding の "	1,070
残留した "	220
消費された "	1,350
生成した酢酸	1,440
(アルコール換算)	1,110
損失アルコール	240
全アルコールに対する酢酸収率	90.4%
消費アルコールに対する収率	104.8%
(モル比としては)	$104.8 \times 46/60 = 0.805$

8. 醱酵液の精製

前記醱酵濾液はこのままでは酢酸石灰となつて居るので、石灰を除くため次の処理を行なつた。濾液を 500 cc とし、攪拌しながら濃硫酸 35g を滴下し、静置冷却しつつ硫酸石灰の沈澱を生成せしめ、吸引濾過後、水酸化バリウムを 2g 加えて吸引濾過後、濾液をイオン交換樹脂アンバーライト IR 120C 層を通過させた。全液量 450cc, 酢酸 14.05%, アルコール濃度 2.08%, 回収率 90% であつた。

総 括

1. 静置、振盪両法に依る培養で通気攪拌酢酸醱酵に適する菌株を撰択し *Acetobacter rancens* (A4) が適して居る事が知れ、この菌はイースト又は酒粕抽出液中で同様な醱酵状態を示し、振盪培養によつて 5 % アルコール液から 70 時間で最高 6.2% の酢酸を生成した。
2. 振盪培養には合成培地は醱酵が悪くペプトンビタミン培地ではほぼ天然培地に近い結果を示した。アルコール濃度は 5 % 近辺が最もよく之以上では醱酵率が悪い。
3. 酢酸塩に対する耐性が強く、特に酢酸石灰に対しては濃度 6~10% でも醱酵に殆ど障害がないので石灰中和の方法が可能である事がわかり高濃度酢酸醱酵の可能性を示唆した。
4. 中和は最初から炭酸石灰を添加して置くのがよく、pH は 5.0 附近に保持するのが望ましい。又アルコールの feeding は連続的に行うのが好い事が確かめられた。多段的に feed する場合では少しずつ回数を多くする方が、一度に大量の feeding を行うよりもよい結果を示した。
5. 多段中和法に依る振盪培養では全培養期間 190 時間で最高 13.6% の酢酸液が得られた。
6. Jar fermenter を用いて通気攪拌に依り酢酸醱酵を行つた。攪拌回転数を大きくして通気量を最小に止め、且培養初期には通気をむしろ行わない方がよい事が確認された。
7. 回転数 950r/m, 通気量 2 l/m 程度で振盪培養の場合とほぼ等しい醱酵状態が見られた。排気口にかなりの注意を払うならば、通気攪拌培養によつても十分に満足出来る結果をもつて酢酸醱酵を行わせる事が出来る事がわかつた。
8. アルコールの feeding とともに炭酸石灰で中和しつつ酢酸醱酵を行い、高濃度酢酸を得る事が出来た。最初アルコール 5 % で培養を始め feeding しつつ炭酸石灰で生成酢酸を中和し、最終全酢酸濃度 14.2% の醱酵液が得られた。残留アルコール量がかなり多かつたが、之は菌の活性を考慮して feeding を行えば解決する問題であ

(234) (井上) 溜 釀 造 用 固 形 麴 に 関 する 研 究 (第1報)

らうと考えられる。

9. 生成した醱酵液中の結合石灰は、硫酸、水酸化バリウム及びイオン交換樹脂処理により完全に除去する事が出来た。かくして精製された酢酸液は酢酸14.05%の香味豊かな濃厚酢として食用に供し得るものである。

文 献

- 1) SCHIMMELL, J.L. : J. Inst. Brewing **60**, 136 (1954).
 - 2) SILBERNAGEL : U.S. Patent. 2,395,510 Feb. 26 (1946).
 - 3) HROMATAKA, O. : Enzymologia **14**, 96 (1950), **15**, 57 (1951).
 - 4) TH. MARKHOF : Austrian Patent 173,231 Nov. 25 (1952).
 - 5) 東大農芸化学教室編：実験農芸化学，(上)，229 (1953).
 - 6) 矢野勝太郎：醸学誌，**13**，789 (1935).
 - 7) RAGHAVENDRA, M.R. RAO et al. : J. Bact **66**, 634 (1953).
 - 8) RAINBOW, C. MISTON, G.W. : J. Gen. Microbiol **9**, 371 (1953).
 - 9) WARREN, H. GOLDMAN, C.H. : J. Food. Res. **18** (6), 646 (1953).
 - 10) TEPPER, B.S. WARREN, L. : C.A. **48**, 7705 (1954).
 - 11) 山田浩一，高橋譲二：農化誌，**26**，427 (1952)，**27**，704 (1953).
- (昭和 32, 4, 22 受理)

溜 釀 造 用 固 形 麴 に 関 する 研 究 (第1報)

プロテアーゼ活性に対する麴原料の水分及び製麴温度の影響について

井 上 昂 (名古屋味噌溜株式会社)

緒 言

溜の釀造に於て原料大豆の処理条件，及び製麴中に生産されるプロテアーゼを初めとする酵素群が，製品である溜の品質に重要な影響を及ぼすことは充分に考えられることである。しかし溜麴の様な大豆単用麴に関する詳しい研究は見当たらない。

最近米麴及び醤油麴について製麴条件，特に製麴温度がプロテアーゼ活性に大きい影響を及ぼしていることが明かにされつつある¹⁻³⁾。又原料処理に当つて，撒水率の多い程原料窒素成分の利用率の高いことが，醤油の分野に於て指摘されている⁴⁾。この事は水分が原料蒸煮過程に於ける大豆蛋白の変性条件，及び製麴過程に於て生産される酵素群の活性に影響を及ぼすものと考えられる。

製麴過程を，その後に続く熟成過程に関与する重要な酵素群の適応の場と考えるならば，その要因として製麴温度のみでなく，麴原料の水分も又製麴温度と関連して注目すべきであろう。

著者は溜麴の製造に当り，麴原料の水分及び製麴温度がどのようにそこに繁殖する麴菌の分泌するプロテアーゼの活性を規定するかと云うこと，及び麴原料の水分を支配する撒水率が原料の窒素成分に及ぼす影響について追及したので，それらの結果を報告する。

実 験 方 法

1. 製麴原料：脱脂大豆（水分10.01%，全窒素7.03%，水溶性全窒素×100/全窒素22.9%）
2. 使用菌株：市販種麴から分離した *Aspergillus sojae*
3. 水溶性全窒素の定量：各条件で蒸煮した脱脂大豆を蒸溜水と共に磨砕し，濾過して得た透明濾液につき KJELDAHL 法で定量した。
4. 製麴法：予め綿栓殺菌した100cc容三角フラスコに脱脂大豆を 5 g 宛採り，夫々実験目的に応じた撒水率で 10 lbs 1 時間蒸煮してから麴菌を接種して恒温器中で製麴した。尚この際目的に応じて殺菌水を添加し，麴原料の水分を調整した。
5. アスベスト麴製造法：市販長繊維アスベストを精製⁵⁾し，100cc容三角フラスコに 1 g 宛採り綿栓後乾熱殺菌した。別に脱脂大豆にその 4 倍量の水を加え 100°C で 4 時間蒸煮し，压榨後濾過して得た濾液をアスベストに 5 cc 宛添加した。14 lbs の圧力で 20 分間加圧殺菌し，麴菌を接種して製麴した。
6. プロテアーゼ活性の測定：麴を 1 % 食塩水と共に 40°C 3 時間振盪して後冷却し（アスベスト麴の場合は 5 分間振盪），濾過して得た透明濾液につき松島氏の方法⁶⁾により pH 6 に於て活性を測定し，相対活性度で表はした。