

[醸工 第45巻, 第2号, p.125~136, 1967]

アルコールの連続醗酵に関する研究

(第2報) Viable yeast の消長に及ぼす醗酵条件について

西山 繁義・入江 淑郎・今井 富雄

(合同酒精株式会社中央研究所)

Studies on Continuous Alcohol Fermentation

(II) On the Fermentation Conditions for Obtaining High Levels of Viable Yeasts

Shigeyoshi Nishiyama, Yoshio Irie and Tomio Imai

(Central Research Lab., Godo-Shusei Co. Ltd., Matsudo, Chiba)

In order to obtain a steady state of continuous alcohol fermentation in corn mash saccharified by *liquid black-koji*, it was necessary to keep high levels of viable yeasts, as reported in previous studies.

In this study some fermentation conditions, which were assumed to be closely related to a viable yeast levels, were tested in batch fermentation.

Fermentation temperature, fermentation methods, yeast strains, kind of medium, sterilization of medium and pH were examined. All these conditions influenced the levels of viable yeasts.

Among these conditions, pH of medium was assumed to be the most important factor.

In order to keep pH above 4.0 addition of supplements, such as CaCO_3 , K_2HPO_4 or urea, was found to be most effective, because it could protect pH of mash from decreasing.

Applying these results to continuous alcohol fermentation using a two vessel system with a 2L-Marubishi jar fermentor, high levels above 90% of viable yeasts could be consequently obtained at a steady state for about 500 hours using both yeast MN-4, which was screened as the most suitable rate for continuous alcohol fermentation, and yeast Hakken-No. 1, with which it was most difficult to keep high levels of viable yeasts in batch culture.

緒 言

前報¹⁾において報告せるとく、著者らは連続醗酵における2~3の条件について検討し、その結果に基づき玉蜀黍糖化液を用いて回分醗酵における growth curve を求め、feed rate を算出し2槽式により連続醗酵を行なった。そして醗酵開始後しばらくは順調な経過を辿ったが、その後醗酵時間の経過とともに第2槽における酵母の弱体化および死滅が甚だしく、viable yeast の減少により遂に連続醗酵の定常状態を維持することが困難となった。

七字ら^{2,3)}は糖蜜ならびに亜硫酸パルプ廃液のアルコール醗酵でみられる酵母の弱体化または死滅現象につき検討を加え、通気、攪拌、培養温度、代謝生産物としてのアルコール濃度、酸度、pH などによる影響が大きいことを報告している。また Joslyn^{4,5)}は酵母の死滅、ならびに自己消化に及ぼす pH、温度、培養条件につき検討を加え自己消化は最適 pH で培養することによりある程度防ぐことができるとしている。この他各種環境と

同様に菌株によっても自己消化の速度が異なり、好氣的条件で培養すると促進されると報告している。さらに、*Sacch. carlsbergensis* を用いた連続醗酵でみられた growth の変動の現象について Finn⁶⁾ は pH の変動が大きな要因であると述べている。一方 KCP 消化液の連続醗酵に関しては富金原ら⁷⁾の報告があり、死滅酵母による悪影響は少ないとしているが、著者らは長期にわたって連続醗酵の定常状態を維持するためには必要量の viable yeast を保持することが肝要であると考え、これに関係すると思われる要因について、2・3の検討を加えた。

すなわち前報で報告したごとく酵母の弱体化および死滅の現象は麦汁培地でみられず、玉蜀黍糖化液培地でみられたこと、また玉蜀黍糖化液培地を用いて連続醗酵を行なった場合 pH が3.6~3.8と異常に低い推移を示したことなどから培地の buffer action の不足などが主な原因と考えられたので、これを補うため、種々の supplement を添加して実験し、この他要因と思われる醗酵方法、培養温度ならびに酵母菌株などの影響についても回分醗酵で検討した。

しかして pH の低下を防ぐことが最も有効であることがわかり、これを連続醗酵試験に応用したところ、酵母の弱体化および死滅を防ぐことができ、長期間にわたり、feed rate の変動に対応した定常状態が得られたのでその結果について報告する。

実験方法

1. 培地の調製 ケニヤ産玉蜀黍を用い第1報¹⁾で述べた方法により調製した。この培地の直糖分は14~15%, 全窒素は 80~90mg/100ml であった。

2. 醗酵方法

1) 回分醗酵は 500 ml 容三角フラスコを用い液量 300 ml で行ない醗酵温度、醗酵方法、培地の種類、酵母菌株の比較ならびに supplement 添加の基礎的条件を検討し、この結果を jar fermentor に応用した。

2) 連続醗酵は丸菱式 jar fermentor (容量 2l, 2槽式) を使用し、液量 1l で第1報で報告した条件で運転した。

3. 分析方法およびその他の実験条件 第1報に記載せるごとくである。

実験結果および考察

1. Viable yeast の消長に関する諸要因の回分醗酵における検討

1) 静置培養と振盪培養 連続醗酵では連続攪拌を行ない液内菌濃度を均一にし近路現象を防ぐので、静置

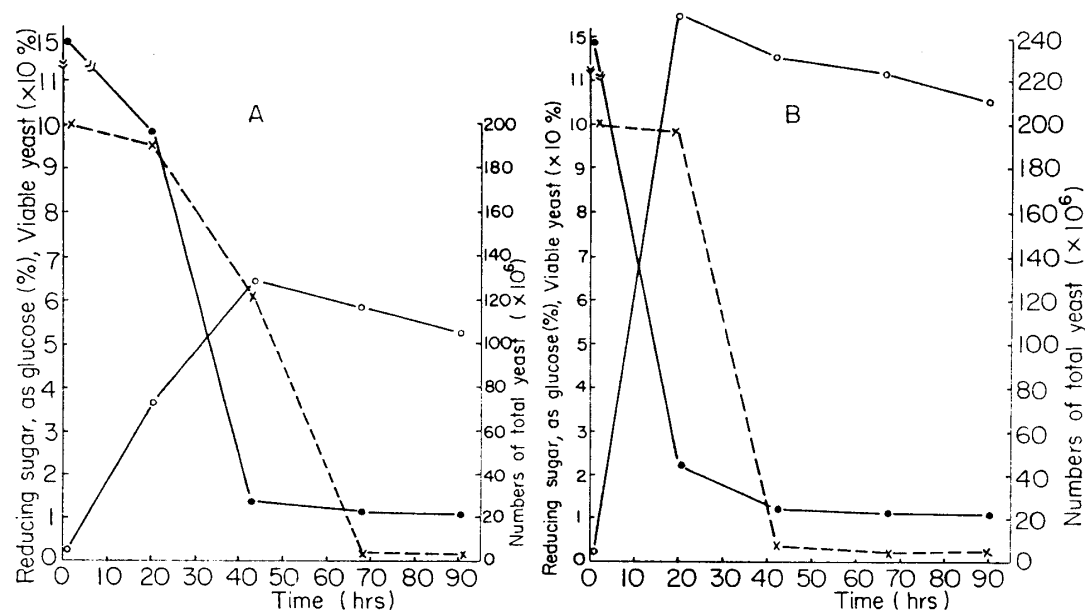


Fig. 1. Influence of fermentation method on viable yeast level, numbers of total yeast and sugar utilization in corn mash saccharified by liquid black-koji. (I)

○·····total yeast ●·····reducing sugar, as glucose ×·····viable yeast

Fermentation method A; stationary fermentation, B; shaken fermentation (150 rpm)

Medium; corn mash saccharified by liquid black-koji, Strain; alcohol yeast H-1, Ferm. temp; $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

培養とは大分異なっている。したがってこの培養方法による影響も考えられるので、静置培養と振盪培養の比較を行なった。この結果を Fig. 1 に示す。酵母の増殖、糖消費速度は振盪培養区分が大であるのは当然であるが、viable yeast % の低下速度も大であった。本実験結果より振盪培養 (jar fermentor 使用) の方が酵母の弱体化または死滅しやすくなっていることがわかったが、これは Joslyn^{4,5)} の報告している事実と一致した。

2) 平行複醸酵と単行複醸酵 蒸煮後冷却し、糖化剤添加後も冷却を続け酵母を加え、糖化と醸酵を平行して行なういわゆる“平行複醸酵”させた場合と、あらかじめ糖化液を作り、それに酵母を投入して醸酵のみさせるいわゆる“単行複醸酵”の場合について viable yeast % におよぼす影響を比較した。ただし培地は同じロットのものを用了。

この結果を Fig. 2 に示す。すなわち pH、酸度などには大差がみられなかったが、酵母の増殖および viable yeast % の消長に対して大きな差がみられた。すなわち平行複醸酵区分の方がいずれもすぐれた結果を示し、特に viable yeast について培養90時間目に70%以上残っているにもかかわらず、単行複醸酵区分では20%に下り後者における viable yeast % の低下の著しいことが認められた。

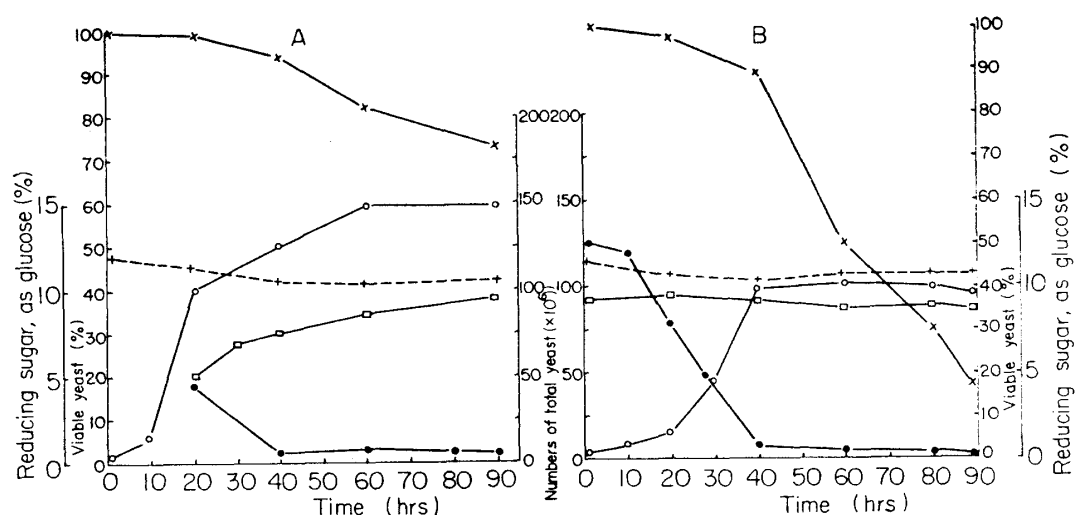


Fig. 2. Influence of fermentation method on viable yeast level, numbers of total yeast and sugar utilization in corn mash saccharified by *liquid black-koji*. (II)

○...total yeast ●...reducing sugar, as glucose ×...viable yeast
+...pH □...acidity

Fermentation method A; Heikō Fukuhakkō, B; Tankō Fukuhakkō

Medium; corn mash saccharified by *liquid black-koji*

Strain; alcohol yeast H-1, Ferm. temp.; 30±1°C.

3) 酵母菌株 酵母も Joslyn^{4,5)} の述べるように菌株により死滅しがたいものと、そうでないものがあると考えられるのでこれについて検討した。菌株として発研 No. 1 菌の他に既知の 8 菌株と著者らが分離した未同定の 3 菌株を用い、静置および振盪培養により比較検討を行なった。この結果を Table 1 に示す。静置および振盪両区分とも大体同一傾向を示した。本実験条件では発研 No. 1 菌は醸酵力は強いが特に死滅しやすいことがわかった。*Schizosacch. mellacei*, *Schizosacch. pombe* および協会 6 号菌は醸酵速度がやや緩慢であるが、醸酵終了後の viable yeast % は高い。また残直糖分がやや多いビール酵母 No. 25 菌は87%以上の高い viable yeast % を示し死滅しがたいことが判明した。連続醸酵に使用する酵母としては醸酵速度が速やかでかつ viable yeast % の高い菌株が望ましいが、以上の結果から我々はこの目的に合致するものとして OC No. 2 菌および著者らの分離した未同定の酵母 MN-4 菌を選んだ。本実験結果より一般に醸酵力の強い酵母は死滅しやすいと言う一見相反する関係がみられたが、さらに醸酵力強く死滅しにくい新しい酵母菌株の分離が必要と思われる。

4) 培地の種類 第1報で報告せるごとく viable yeast % は麦汁培地では高く、玉蜀黍糖化液培地では低下することが認められたので、玉蜀黍糖化液と麦汁ならびに buffer action の強い糖蜜培地の混合比率を変えて醸酵させ viable yeast % に及ぼす影響について検討した。

Table 1. Influence of various yeast strains on viable yeast levels in stationary or shaken fermentation.

Division		Stationary fermentation								Shaken fermentation							
hr		63				111				41				97			
Analysis Strain		O.D.*	V.Y.**	Acidity (ml)	R.S.***	O.D.	V.Y.	Acidity (ml)	R.S.	O.D.	V.Y.	Acidity (ml)	R.S.	O.D.	V.Y.	Acidity (ml)	R.S.
<i>Alcohol yeast</i> H-1		0.59	18	3.90	0.56	0.57	7	3.80	0.29	0.88	63	5.00	0.52	0.91	2	4.10	0.31
<i>Molasses yeast</i> No. 396		0.67	76	3.90	0.59	0.65	26	4.10	0.34	0.93	95	4.50	0.88	0.95	62	6.60	0.87
<i>Wine yeast</i> OC No. 2		0.74	60	4.30	0.64	0.74	26	4.20	0.32	1.01	80	5.20	0.55	1.03	68	4.70	0.23
<i>Beer yeast</i> No. 25		0.61	98	3.40	0.73	0.70	87	4.20	0.60	1.00	99	4.60	0.82	1.00	95	4.60	0.78
<i>Sake yeast</i> Kyōkai No. 6		0.61	83	4.31	1.07	0.66	44	4.20	0.42	0.92	97	5.20	0.90	0.92	70	6.90	0.90
<i>Sake yeast</i> Kyōkai No. 7		0.69	67	4.40	0.51	0.62	6	4.10	0.40	0.96	91	4.70	0.91	0.98	44	6.00	0.86
<i>Schizosacch. mellacei</i>		0.75	58	4.62	0.08	0.77	38	4.60	0.33	0.96	97	4.50	0.43	0.96	27	11.20	0.25
<i>Schizosacch. pombe</i>		0.77	60	4.21	1.89	0.83	47	4.10	0.33	0.71	98	5.00	0.68	0.73	83	9.70	0.25
<i>Isolated yeast</i> KN-29		0.70	70	3.90	0.58	0.66	15	4.20	0.39	0.94	92	5.20	0.88	0.95	40	7.20	0.88
<i>Isolated yeast</i> MN-4		0.74	50	3.90	0.84	0.74	29	4.30	0.24	1.00	98	5.20	0.38	0.97	72	6.60	0.25
<i>Isolated yeast</i> RN-51		0.82	86	4.00	0.68	0.79	81	4.10	0.35	1.19	97	3.80	0.98	1.11	5	3.40	0.98

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation, Ferm. temp.; 25±1°C

*O.D.; absorbancy at 530 mμ of 20 times diluted mash, **V.Y.; viable yeast (%)

***R.S.; reducing sugar, as glucose (%).

(1) 玉蜀黍糖化液と麦汁混合培地 この結果を Table 2 に示す。麦汁培地の pH が5.30であるので玉蜀黍糖化液の pH も 5.28 に補正した。主酵終了後の viable yeast % の推移をみるに麦汁区分が111時間目に36%と最も高い値を示し、同様の結果が両者混合区分でも得られた。しかし玉蜀黍糖化液単独区分は8%と低い値しか示さなかった。

Table 2. Influence of the kind of medium on viable yeast level, numbers of total yeast and sugar utilization. (I)

Composition of medium													
		pH			Brix			Acidity (ml)			R.S.		
Corn mash		5.28			16.6			2.4			14.77		
Wort		5.30			17.7			5.0			12.29		
Analysis of fermented mash													
hr		39			63			87			111		
Ratio of corn mash : wort		T.Y.*	V.Y.**	R.S.***	T.Y.	V.Y.	R.S.	T.Y.	V.Y.	R.S.	T.Y.	V.Y.	R.S.
1 : 0		52	93	6.3	98	94	1.3	98	64	1.0	72	8	0.7
1 : 1		120	93	2.4	180	91	0.8	172	72	0.6	144	34	0.5
0 : 1		108	100	1.8	168	91	0.8	162	92	0.7	152	36	0.8

Medium; wort or corn mash saccharified by liquid black-koji was used in the shown ratio.

Fermentation condition; stationary, Temp.; 30±1°C, Strain; alcohol yeast H-1.

*total yeast (×10⁶), **viable yeast (%), ***reducing sugar, as glucose or maltose (%).

(2) 玉蜀黍糖化液と糖蜜混合培地 この結果は Table 3 に示すごとく麦汁混合培地と同様な傾向を示した。

Table 3. Influence of the kind of medium on viable yeast level, numbers of total yeast and sugar utilization. (II)

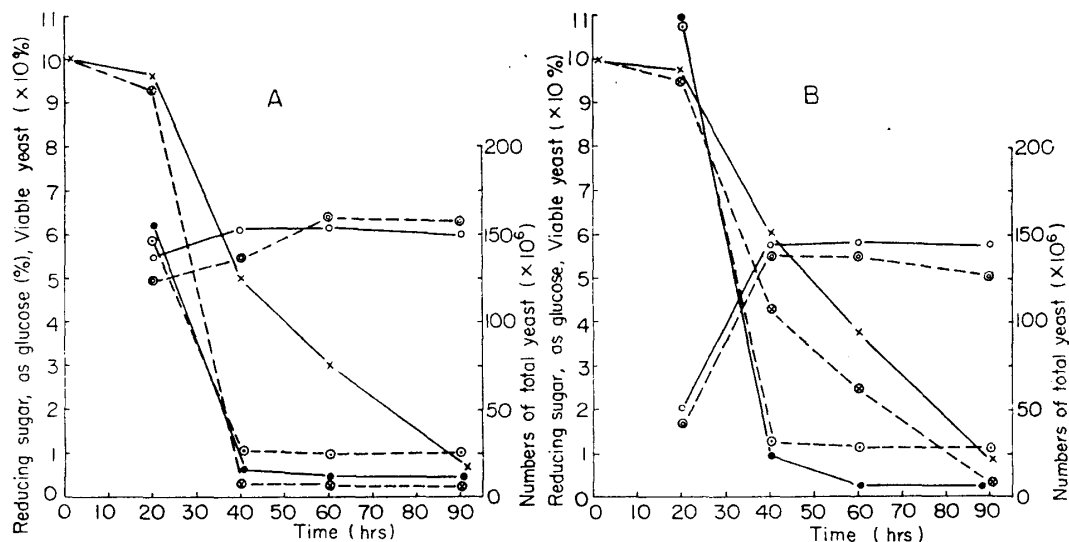
Composition of medium												
	pH			Brix			Acidity (ml)			R.S.		
Corn mash	5.20			16.0			2.5			14.50		
Molasses	5.30			24.0			2.2			15.90		

Analysis of fermented mash												
hr	28			50			76			100		
Ratio of corn mash : molasses	T.Y.*	V.Y.**	R.S.***	T.Y.	V.Y.	R.S.	T.Y.	V.Y.	R.S.	T.Y.	V.Y.	R.S.
1 : 0	40	92	10.2	100	85	3.7	70	56	0.7	70	7	0.4
1 : 1	85	98	7.9	120	80	2.2	100	50	0.9	100	38	0.9
0 : 1	50	90	5.8	110	97	3.8	90	80	1.3	90	84	1.2

Mixed medium; molasses and corn mash saccharified by *liquid black-koji*.Fermentation condition; stationary, Temp.; $30 \pm 1^\circ\text{C}$, Strain; alcohol yeast H-1.*total yeast ($\times 10^6$), **viable yeast (%), ***reducing sugar, as glucose or total sugar, as glucose (%).

以上の結果より、玉蜀黍糖化液単独の培地では麦汁または糖蜜培地のいずれと比較しても、viable yeast % 主醸酵期にはほとんど差はないが、醸酵後期になると急激に低下し、麦汁または糖蜜を玉蜀黍糖化液に対して 1:1 混合すると、その低下を防ぐことができた。この結果から培地の種類によっても viable yeast % が影響を受けることが判明した。

5) 培地の殺菌 玉蜀黍を 55°C 40時間液体麴で糖化した醗をそのままいわゆる“単行複醸酵”させた区分と濾過して同様にいわゆる“単行醸酵”させた区分について、殺菌が viable yeast % に及ぼす影響を検討した。この結果を Fig. 3 に示す。

Fig. 3. Influence of pasteurization of medium (100°C 30 min) on viable yeast level, numbers of total yeast and sugar utilization.

○●---total yeast ●●---reducing sugar, as glucose ×⊗---viable yeast
 ——— non pasteurization - - - - - pasteurization

A; Tankō Fukuhakkō B; Tankō Hakkō
 Medium; corn mash saccharified by *liquid black-koji*
 Strain; alcohol yeast H-1, Ferm. temp.; $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

酵母の増殖は糖化醪をそのまま醗酵させた場合には殺菌区分が約60時間位までは劣るが、その後かえって良くなり、糖化醪を濾過して醗酵させた場合には終始殺菌区分がわずかではあるが劣るようであった。また両培地とも殺菌により viable yeast % の低下は速やかとなり、その傾向は濾過した醪の方に強く現われた。また一方残直糖分も殺菌により増加したがこれは殺菌により糖が醗酵性から非醗酵性へと変化したものと考えられる。

殺菌は醪中の糖化剤に由来する酵素作用を停止させ、かつ微量成分などを熱変性させることが考えられるが、いずれにせよこの操作は viable yeast % の消長に対して負の結果をもたらすものようである。

6) 醗酵温度 醗酵温度を 25°C, 30°C とし液体麹および酵素剤糖化液を用い, jar fermentor で回分醗酵により viable yeast の消長を求めた。この結果を Fig. 4 に示す。

すなわちいずれの糖化液を用いても、醗酵初期には 30°C 区分の方が全酵母数も幾分多く、直糖分の消費速度も速いようであったが、醗酵が中期以降になると 25°C 区分に比べて逆に悪化する。しかし viable yeast % は終始 25°C 区分の方が 30°C 区分に比較してすぐれており、特に醗酵後期にその差が顕著に現われる。したがって 25°C 区分の方が残直糖分も少なく、醗酵に良い影響を及ぼすことがわかった。これらは七字²⁾, Joslyn⁴⁾が報告している通りである。

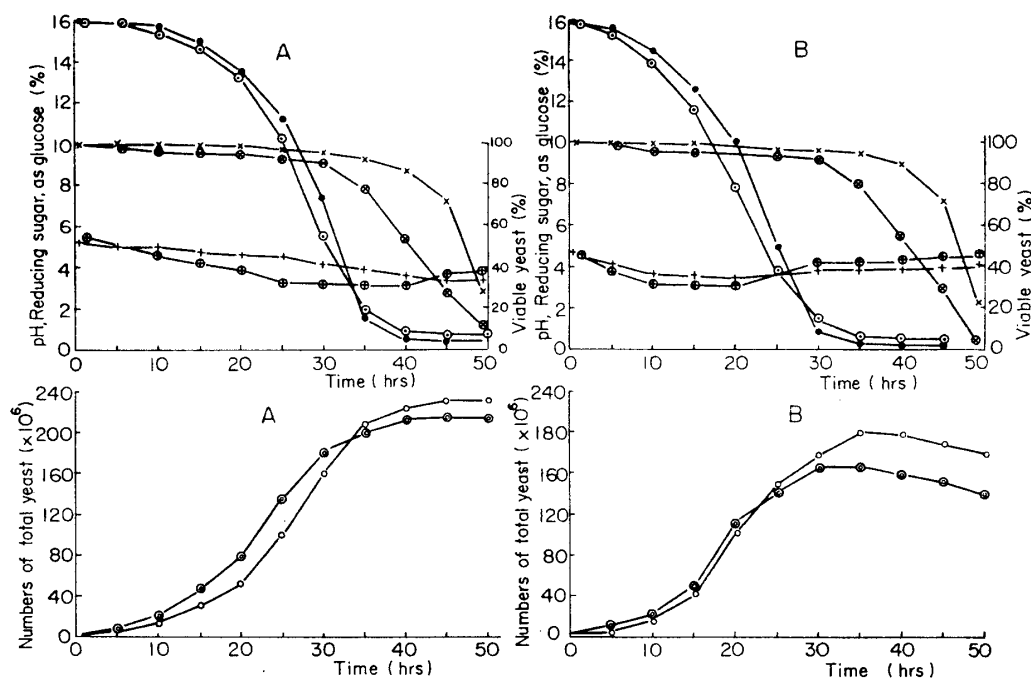


Fig. 4. Influence of fermentation temperature on viable yeast level, sugar utilization and numbers of total yeast.

Fermentation temperature; 25±1°C

○...total yeast ●...reducing sugar, as glucose ×...viable yeast +...pH

Fermentation temperature; 30±1°C

⊙...total yeast ⊙...reducing sugar, as glucose ⊗...viable yeast ⊕...pH

Medium; A corn mash saccharified by *liquid black-koji*

B corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Strain; alcohol yeast H-1, Agitation; 110 rpm, non aeration.

7) pH Viable yeast % の消長に関する因子の1つとして pH が考えられるので、その影響を調べた。玉蜀黍糖化液では培養が進むに従いかなり pH が低下する。特に jar fermentor で攪拌しながら培養したり連続醗酵した場合にはなほだしく、主醗酵の時に pH 3.5~3.6 と最も低く、後醗酵では幾分上昇した。この pH の低下は培地自体の buffer action と深い関係があると考え supplement を添加し pH の低下を防ぐ検討を行なった。

(1) 培地の **buffer action** におよぼす各種 **supplement** の影響 Buffer action の測定は日立M-3型 pH 計を用い, sample 20ml に N/10 H_2SO_4 または N/10 NaOH を加え pH の移動巾より β を算出し $\times 10^{-3}$ で表示した.

Supplement としては粉末酵母エキス・ポリペプトン・硝酸ソーダ・過磷酸石灰・磷酸 2 カリウム・尿素・炭酸カルシウムその他を用い添加量は 0.5% とした. 主な supplement の buffer action curve を Fig. 5 に示す. 基本培地に液体麹で糖化した培地と酵素剤 (スピターゼ A.L. およびグルクザイム) で糖化した培地を用いた場合の buffer action について比較すると, 液体麹で糖化した区分の方が幾分高い β を示す. しかし基本培地の差による影響より, 個々の supplement による影響の方が大きいようである. supplement としては炭酸カルシウムが最も有効で酵素剤糖化液使用の場合は pH 4.0~4.2 で, また液体麹糖化液使用の場合は pH 4.8~5.0 でそれぞれ高い β を示し, これを添加することにより培地の pH を 4.0 以下に低下するのを防ぐことができる. 磷酸 2 カリウム添加では pH が上昇し, 中性付近で高い β を示す. 尿素有添加によつてはほとんど β の増加を期待できないが, 醸酵中尿素が分解利用されるにしたがつて pH の低下防止に役立つものと考えられる.

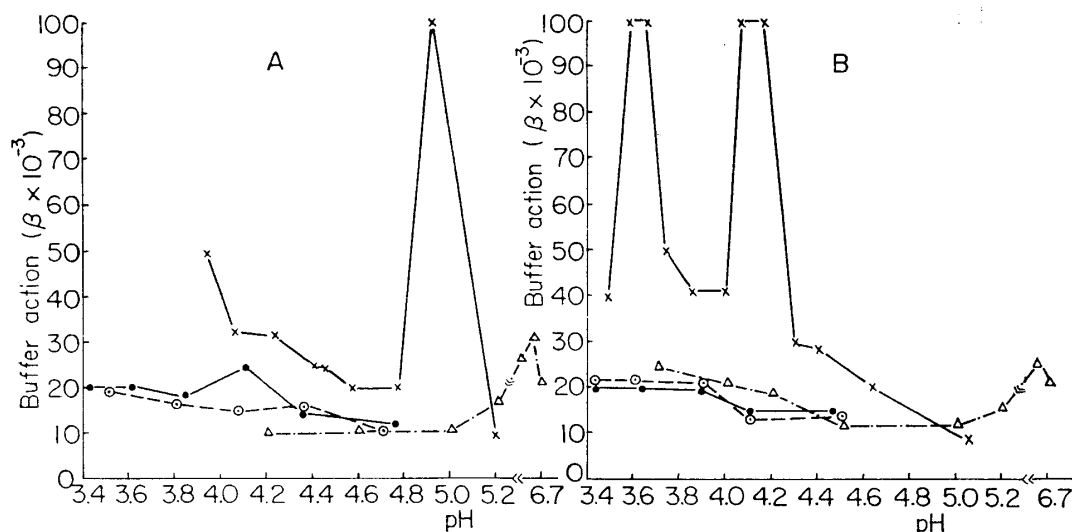


Fig. 5. Relation between buffer action and supplement in different corn medium.

●...control (no addition) ×... CaCO_3 ○... $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ △... K_2HPO_4

Medium; A corn mash saccharified by *liquid black-koji*

B corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Weight % of added supplement; 0.5%.

(2) **Supplement 添加醸酵試験** これら buffer action の増加に有効と思われる supplement を添加し常法通り醸酵試験を行ない viable yeast に及ぼす影響について検討した. この結果を Fig. 6, Fig. 7 に示す.

主醸酵中は各区分とも一様に高い viable yeast % を示したので省略し, 40時間目から90時間目のものについて両者の関係を表示した. 図より明らかなごとく, 粉末酵母エキス・硝酸ソーダ・磷酸 1 カリウム・ポリペプトンをそれぞれ 0.5% 添加した区分は対照の無添加区分とほぼ同一 viable yeast % の低下を示したことより supplement としての効果はほとんど認められなかった. さらに過磷酸石灰添加区分では viable yeast % の低下速度が大きく, 60時間目には 1~2% となり負の結果を示した. 同様に磷酸アンモニウム, 磷酸カルシウム添加によつても急激な低下が認められた. しかし磷酸 2 カリウム, 炭酸カルシウム (それぞれ 0.5% 添加), ソーダ石灰 (0.05% 添加) 区分では supplement としての効果が認められ, 特に磷酸 2 カリウム添加区分では90時間目の viable yeast % は 50% の値を示した. しかし磷酸 2 カリウムを添加した場合の醸酵速度は, 40時間目に 1.2% の残直糖分があったことより他の区分に比べて幾分遅くなるように見受けられた. 本実験結果より有効な supplement として炭酸カルシウム・磷酸 2 カリウムをえらんだ. なおソーダ石灰は buffer action を高める効果は少ないが, 中和により pH の低下を防ぎ, viable yeast % を高く保つのに有効と思われた.

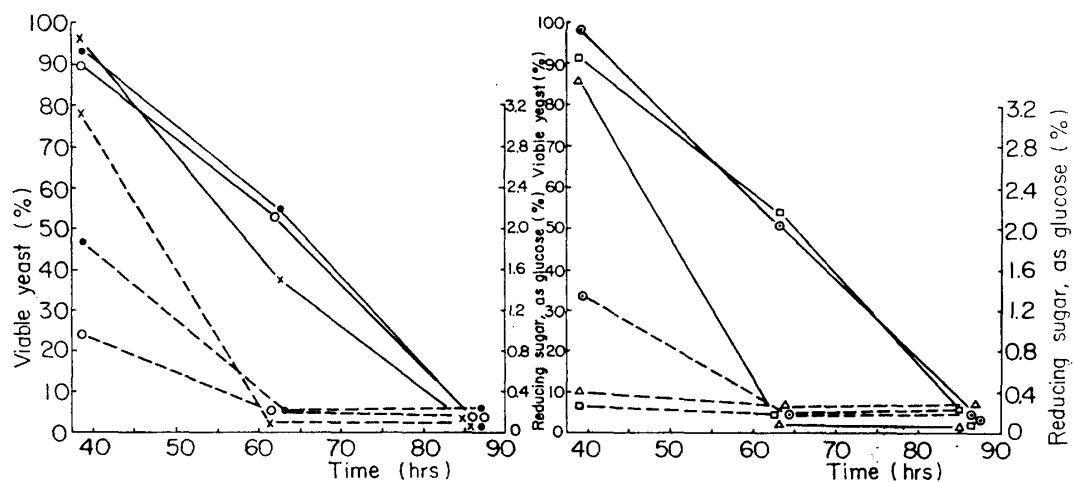


Fig. 6. Influence of various supplements on viable yeast level and sugar utilization. (I)

●...control (no addition) ○... KH_2PO_4 ○...powdery yeast extract
 ×... NaNO_3 □...poly pepton △...calcium perphosphate
 — viable yeast ---- reducing sugar, as glucose

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation.

Weight % of added supplements; 0.5%, Strain; alcohol yeast H-1

Ferm. temp.; $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

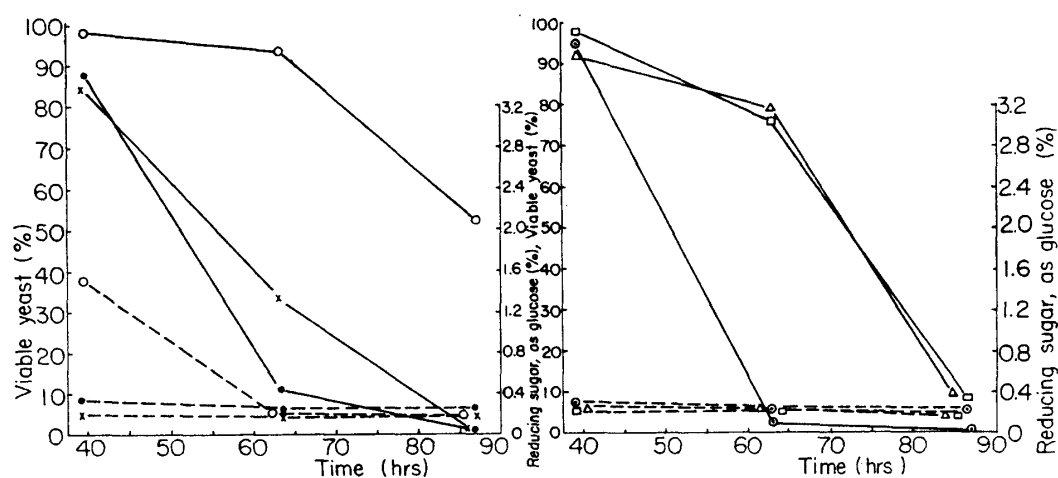


Fig. 7. Influence of various supplements on viable yeast level and sugar utilization. (II)

○... K_2HPO_4 ×... $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ △...soda lime ●... $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 ○... $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2\text{HO}$ □... CaCO_3
 — viable yeast ---- reducing sugar, as glucose

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation.

Weight % of added supplements; 0.5% (except soda lime), soda lime; 0.05%

Strain; alcohol yeast H-1, Ferm. temp.; $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

(3) 炭酸カルシウムの最適添加量 本実験結果を Fig. 8-1, 2 に示す。0.2%も添加すれば buffer action の増加も認められ、醗酵終了後の viable yeast % も高かった。

ただし注意せねばならないのは無添加区分のアルコールが 7.2 容量%で最も高く、炭酸カルシウム添加量の増加によりアルコール生産量は 6.9~6.8 容量%に稍減少する傾向を示すことである。ゆえに添加量は必要最小限におさえることが肝要と思われる。

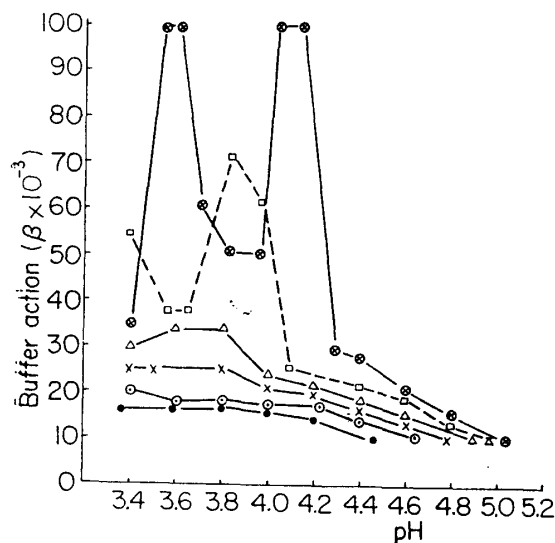


Fig. 8-1. Influence of CaCO_3 concentration on buffer action in mash.

●...control (non) ○...0.1% ×...0.2%
△...0.3% □...0.4% ⊗...0.5%

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation.

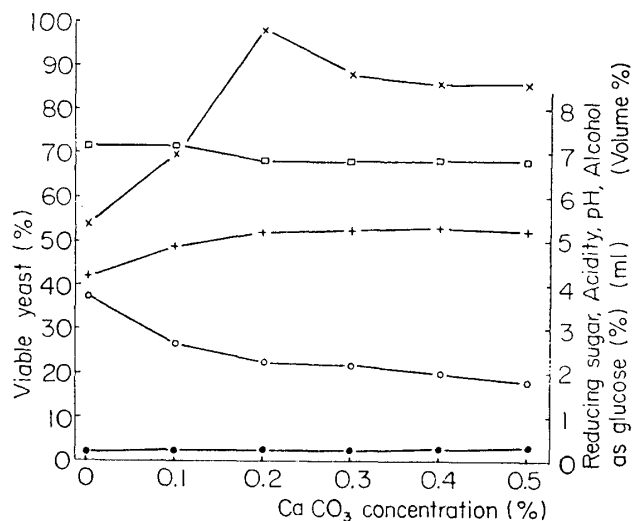


Fig. 8-2. Influence of CaCO_3 concentration on viable yeast level, sugar utilization, acidity, pH and alcohol production.

●...reducing sugar ×...viable yeast +...pH
○...acidity □...alcohol (volume %)

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation, Strain; alcohol yeast H-1
Ferm. temp.; $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Ferm. time; 75 hr.

(4) 磷酸 2 カリウムの最適添加量 この結果を Fig. 9 に示す。醸酵終了時の viable yeast % は磷酸 2 カリウムの少量添加によっても 20~30% 向上せしめることができた。

アルコール容量%も添加量を増すに従って前実験同様減少の傾向を示した。したがって添加量は 0.1~0.2% が適当と考えられる。

2. 回分醸酵による検討結果を応用した連続醸酵

回分醸酵により viable yeast の消長に及ぼす諸要因を検討したが、このうち最も主要な要因と考えられる pH の維持などについて検討した結果を応用して連続醸酵を行ない、その効果を調べた。しかし醸酵温度は回分醸酵の結果から 25°C とした。また通気および攪拌条件については第 1 報に準じた。

1) MN-4 菌を用いた場合 回分醸酵において酵母の増殖および糖消費速度ともにすぐれ、醸酵後期における viable yeast % も高い値を示した MN-4 菌を用いて連続醸酵を行なった。この結果を Fig. 10 に示す。

Supplement としては回分醸酵で良い成績を示し工業的にも使用し得る炭酸カルシウムおよび尿素を選び添加した。また単に pH 補正のみの効果を調べるために 10% NaOH 溶液も用いた。これらの supple-

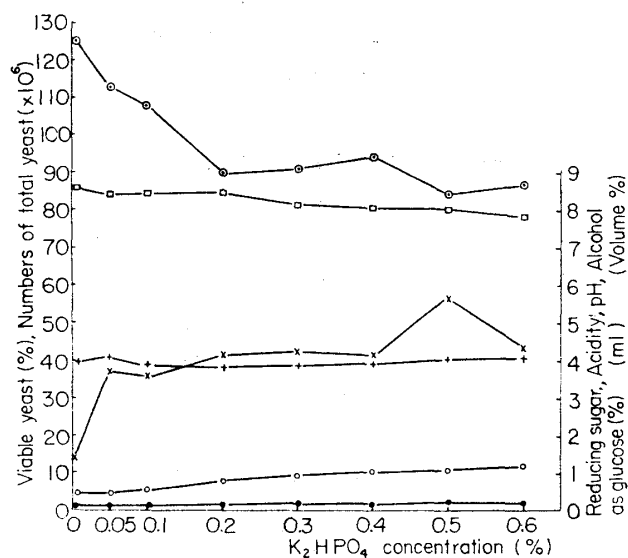


Fig. 9. Influence of K_2HPO_4 concentration on viable yeast level and other analysis values of fermented mash.

⊙...total yeast ●...reducing sugar, as glucose
+...pH ○...acidity □...alcohol (volume %)
×...viable yeast

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation, Strain; alcohol yeast H-1
Ferm. temp.; $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Ferm. time; 75 hr.

ment は第1槽に対してのみ行ない、添加量は 0.2% とし、pH が 4.0 以下に低下するのを防いだ。

添加時期は毎日午前9時と午後6時の2回無菌的に行なった。しかして feed rate は平均 90ml/hr で、酵母濃度は第1槽で $240 \sim 280 \times 10^6/\text{ml}$ 、第2槽では $360 \sim 400 \times 10^6/\text{ml}$ を示し、定常状態が約 21日間にわたって得られた。また第1槽の残直糖分には幾分変動がみられるが、第2槽の残直糖分は 0.2~0.3% で2槽式により醸酵を完結せしめることができた。supplement 添加期間中の viable yeast % は第1、第2槽とも99~100%を示し、いずれの分析値からも supplement 間には大きな差が見られなかった。ただし醸酵開始後22日目および23日目の2日間 supplement の添加を行なわなかったところ、酵母濃度は低下の傾向を示し viable yeast も低下し、同時に残直糖分も増加したので supplement の効果が確認されたものと考えられる。また受槽の一般分析結果を Fig. 11 に示す。すなわち supplement の添加によりアルコール分 8.5~8.8 容量%, pH 4.1~4.4, 酸度 2.8~3.2, 残直糖分 0.2~0.25%の範囲内で定常状態が得られることがわかる。

2) 発研 No. 1 菌を用いた場合 回分醸酵における酵母菌株比較試験の結果最も死滅しやすい発研 No. 1 菌について同様な実験を行なった。この結果を Fig. 12 に示す。

Supplement として炭酸カルシウム、尿素の他今回は磷酸 2 カリウムをそれぞれ 0.2% 使用した。また pH を調整するため 10% NaOH 溶液を用いた。しかして平均 90ml/hr の feed rate のもとで20日間にわたって連続醸酵を行なったが、この結果いずれの supplement を添加した場合でも回分醸酵におけると同様に pH が 4.0 以下に低下するのを防ぐことができ、viable yeast % も第1槽で 98~100%, 第2槽で 90~94% の高い level を保ち、残直糖分、酵母濃度にも変動が少なく定常状態が得られた。ただ13日目に培地をあらかじめ pH を補正したものに切替えたところ、第1槽の残直糖分が約 2%増加して 6%を示した。これは当時の feed rate に大きな変動が無かったことおよびあらかじめ培地の pH を 10% NaOH 溶液で補正した際、培地の pH が等電点 (pH 5.1~5.3) と一致し、100°C 20分 1 回殺菌に依り蛋白の凝固析出量が増加し、培地を使用する時除去されたので酵母の窒素源などが不足になったためではないかと考えられる。

受槽の一般成分は supplement を添加した場合には

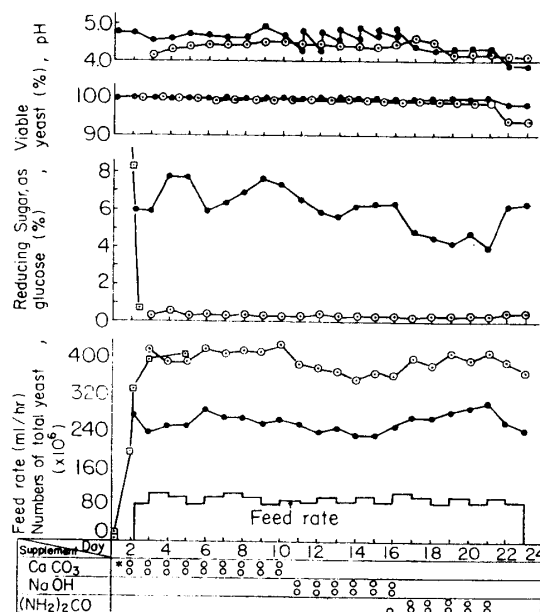


Fig. 10. Time course of two stage continuous fermentation in saccharified corn medium with addition of supplements. (I)-1

□...batch fermentation ●...1st fermentor ○...2nd fermentor

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Strain; alcohol yeast MN-4 (isolated newly)

Ferm. temp.; $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

*each supplement of 0.2% was added to only 1st fermentor at intervals of 10-20 hr.

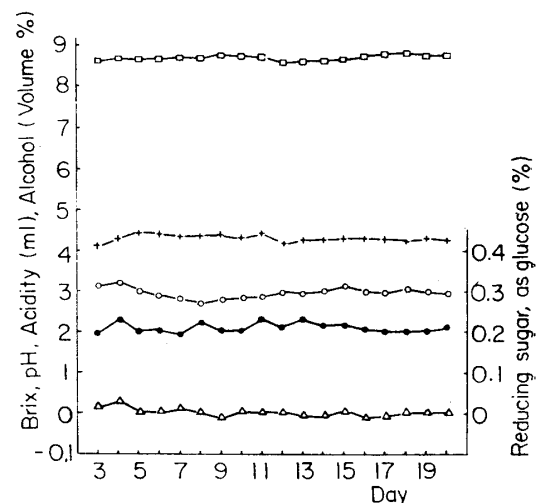


Fig. 11. Time course of two stage continuous fermentation in saccharified corn medium with addition of supplements. (I)-2

●...reducing sugar □...alcohol (volume %) ○...acidity △...brix +...pH

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Strain; alcohol yeast MN-4 (isolated newly)

Ferm. temp.; $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Fig. 13 に示すように大体一定していた。すなわちアルコール分 8.7~8.9 容量%, 残直糖分 0.2~0.3%, pH 4.0~5.0, 酸度 2.5~3.5 であり, 平均 90ml/hr の feed rate で 2 槽式によりかなり安定した醗酵成績を収めることができた。

すなわち supplement を添加することにより, 死滅しやすい発研 No. 1 菌を使用し, かつ酵母の死滅しやすい玉蜀黍糖化液を用いた場合でも長期にわたり安定した連続醗酵を行なうことができたのである。

要 約

玉蜀黍糖化液を使用してアルコールの連続醗酵を行なう場合における viable yeast の消長に影響する醗酵条件について検討した結果はつぎのごとくである。

1 回分醗酵における検討

1) 静置培養に比し振盪培養の場合には, 酵母の growth, 糖の消費速度ともにすぐれていたが, viable yeast % の低下ははなはだしかった。

2) 単行複醗酵に比し併行複醗酵の場合には, 酵母の growth および viable yeast % がすぐれ, 特に viable yeast % の差が大であった。

3) 既知の酵母 8 株と著者らの分離した未同定の酵母 3 株を用いて試験したところ, 醗酵速度の稍緩慢なものは醗酵終了後の viable yeast % は高く, 逆に醗酵速度の速い酵母に弱体化または死滅しやすいものが多いようであった。発研 No. 1 菌は後者に属すると思われた。しかし醗酵速度も速かつ viable yeast % も比較的高い酵母として OC No. 2 菌および著者らの分離した MN-4 菌を選択した。

4) 玉蜀黍糖化液では麦汁や糖蜜に比し醗酵後期における viable yeast % の低下がはなはだしく, 玉蜀黍糖化液を麦汁, または糖蜜と 1:1 に混合すると viable yeast % の低下が防止できた。

5) 平行複醗酵, 単行複醗酵いずれの場合でも培地を殺菌すると viable yeast % を低下させるように思われた。

6) 醗酵温度について 25°C および 30°C の場合を比較したところ, viable yeast %, 酵母の growth, 糖の消費率ともに 25°C 区分の方がすぐれ, 特に醗酵の後期にその差が大きく現われた。

7) 液体麹で糖化した培地と酵素剤 (スピターゼ A.L., グルクザイム) で糖化した培地を基本培地にし, 培地の buffer action を高めるのに適当な supplement を選んだところ, 基本培地による差は少なく, 炭酸カルシウムおよび磷酸 2 カリウムが適当であるこ

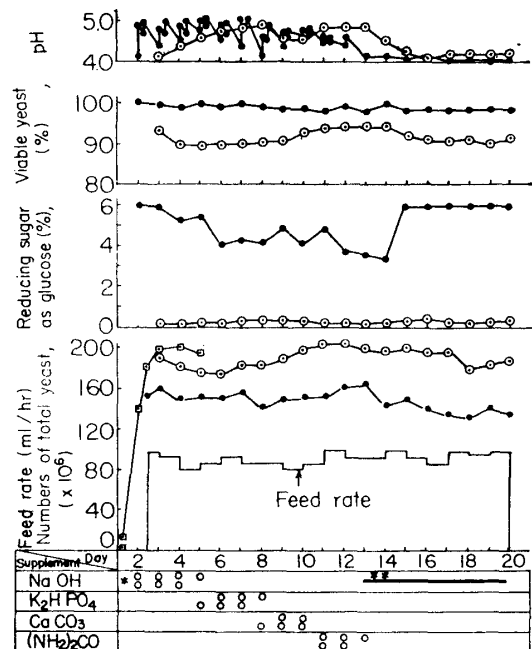


Fig. 12. Time course of two stage continuous fermentation in saccharified corn medium with addition of supplements. (II)-1

□...batch fermentation ●...1st fermentor ○...2nd fermentor

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Strain; alcohol yeast H-1

Ferm. temp.; 25±1°C

*each supplement of 0.2% was added to only 1st fermentor at intervals of 10-20 hr.

**10% solution of NaOH was added to the medium and adjusted its pH before the fermentation.

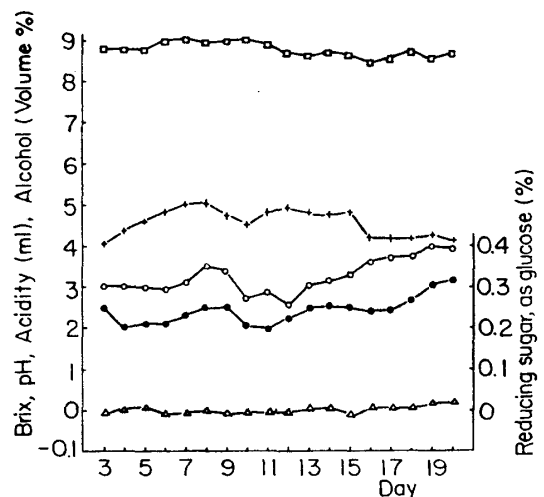


Fig. 13. Time course of two stage continuous fermentation in saccharified corn medium with addition of supplements. (II)-2

●...reducing sugar □...alcohol (volume %) ○...acidity △...brix +...pH

Medium; corn mash saccharified by commercial enzyme preparation

Strain; alcohol yeast H-1

Ferm. temp.; 25±1°C.

とがわかった。しかしその最適添加量は共に約 0.2%であった。

また粉末酵母エキス, ポリペプトン, 硝酸ソーダ, 過燐酸石灰, 燐酸アンモニウム, 燐酸カルシウムなどは無効と思われた。一方尿素およびカセイソーダ, ならびにソーダ石灰は buffer action の増加には有効ではないが, 燐酸中 pH の低下防止に役立つものと思われる。しかし pH の低下を防ぎ pH を 4.0 以上に保つことが viable yeast %を高く維持するのに有効と思われた。

2. 回分燐酸による検討結果を応用し, 最も連続燐酸に適する菌として選択した MN-4 菌および最も弱化した死滅しやすい発研 No. 1 菌を用い連続燐酸を行なったところ, いずれの場合でも 90% 以上の高い viable yeast %を維持することができ, 長期にわたって, feed rate の変動に対応した定常状態が得られた。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を賜った合同酒精株式会社堀常務に厚く御礼申し上げます。なお発表の機会を与えられた当社石家社長ならびに役員室に対して謝意を表わします。

本報告の要旨は日本燐酸工学会昭和40年度大会で発表した。

文 献

- 1) 西山, 入江, 今井: 本誌, **44**, 902(1966).
 - 2) 七字, 長谷川: 発研報, **7**, 18 (1952), **7**, 9 (1952).
 - 3) 七字, 長谷川, 御園: 燐協誌, **11**, 377 (1953).
 - 4) Vost, D. C., Joslyn, M. A.: *Appl. Microbiol.*, **2**, 70 (1954).
 - 5) Joslyn, M. A.: *Wallerstein Lab. Com.*, **18**, 191 (1955).
 - 6) Finn, R. K., Wilson, R. E.: *Agr. Food. Chem.*, **2**, 66 (1954).
 - 7) 秋葉, 黒田, 富金原: 合酒技, **30**, 573 (1963).
- (昭 41. 6. 3 受付)