

[J. Ferment. Technol., Vol. 51, No. 3, p. 205~208, 1973]

〔ノ ー ト〕

酵母増殖曲線からエタノール生成曲線を推定する方法

永 谷 正 治

国税庁醸造試験所

Estimation of Ethanol Production from the Growth History
of Yeast Cells during Alcoholic Fermentation

Masaharu Nagatani

National Research Institute of Brewing, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo

The rate of ethanol production during alcoholic fermentation was formulated as a function of the specific growth rate, μ , of yeast cells by using the correlation from Luedeking and Piret as:

$$\frac{dp}{dt} = \alpha\mu X + \nu_{mo} e^{-k_2 p} X$$

The α value could be designated as the ratio of $Y_{p/s}$ (yield coefficient of ethanol to glucose) to Y_g (maximum growth yield on glucose) and the numerical value could be assessed at around 3.5 (dimensionless).

The expression of the second term of above equation, which corresponds to the rate of ethanol production by the maintenance metabolism of the cells, was introduced by assuming the metabolism to be under the inhibition of accumulated ethanol as observed in the later period of *saké* fermentation. The value of ν_{mo} was assumed to be equivalent to the Q_{CO_2} value of the resting yeast cells.

Above equation was used for the prediction of ethanol production in batch fermentation the growth history of whose yeast cells was known. First, the growth curve of the cells was simulated by a function of time, t . Second, this function ($X=f(t)$) was differentiated with respect to time, thus leading to $dX/dt (= \mu X) = f'(t)$. And third, these two functions of time were substituted into the equation and solved numerically. A digital computer was used for this series of calculations.

The results of the calculation followed the change in ethanol concentration observed in three examples of various batch fermentations.

アルコール醸酵においてはエタノール生成速度 dp/dt は酵母密度 X とその醸酵能 $\nu (=1/X \cdot dp/dt)$ との積であらわされる。しかし酵母の増殖曲線 (回分) は培地の種類をはじめ種々の環境因子に著しく影響されるため一般的な予測は困難であり、増殖連動型であるエタノール生成速度も同じ理由で予測が難かしく回分醸酵の設計に不便が感じられる。

Luedeking ら¹⁾によれば乳酸醸酵における菌体比増殖速度 μ と醸酵能 ν との関係は次式であらわされる。

$$\nu = \alpha\mu + \nu_m \quad (1)$$

ただし α は定数。 ν_m は維持代謝に由来する醸酵能である。

そこで菌体増殖曲線は個々の醸酵条件の下で近似式

を導くかあるいは実測するものとし、 ν を(1)式のように μ の関数として一般化しておけばエタノール生成曲線を予測する作業はかなり簡単になる。著者は清酒醪の初期の発熱速度(エタノール生成速度に比例する)を知る必要から(1)式を利用することを考え、定数 α および ν_m の内容を検討した。

酵母が消費するグルコースは通常の天然培地ではすべてエネルギー源として用いられるものと仮定する。そこでグルコース全消費量 ΔS_t を増殖エネルギー生産に用いられた区分 ΔS_o と維持代謝のエネルギー生産にあてられた区分 ΔS_m とに分ければ、

$$\Delta S_t = \Delta S_o + \Delta S_m \quad (2)$$

つぎに Pirt²⁾, van Uden^{3,4)}らに従い maximum growth yield $Y_o (= \Delta X / \Delta S_o)$ を導入し、 $\mu = (1/X)(\Delta X / \Delta t)$ とあらわして(2)式を整理すると(3)式がえられる。

$$\frac{\Delta S_t}{X \Delta t} = \frac{\mu}{Y_o} + \frac{\Delta S_m}{X \Delta t} \quad (3)$$

グルコースに対するエタノールの収率 $Y_{p/s} (= \Delta p / \Delta S)$ は前出の仮定によりグルコースがすべて解糖系によってエタノールに代謝されるものとすれば一定とみなすことができるので(3)式の両辺にこれに乗じて S を p に変換すれば、

$$\frac{\Delta p}{X \Delta t} = \frac{Y_{p/s}}{Y_o} \mu + \left(\frac{\Delta p}{X \Delta t} \right)_m \quad (4)$$

(4)式の左辺は醱酵能、右辺第2項は維持代謝のための醱酵能であるから(1)式と比較して、

$$\alpha = \frac{Y_{p/s}}{Y_o} \quad (5)$$

および、

$$\nu_m = \left(\frac{\Delta p}{X \Delta t} \right)_m \quad (6)$$

となる。すなわち(4)式は(2)式の仮定に基づいて(1)式を定量的に考察したものである。そこで α および ν_m の値を以下の方法で定めた。

$Y_{p/s}$ の値は stoichiometry によれば 0.512 g/g であるが実測すると約 0.5 となり、培養条件、酵母の種類などにほとんど影響されない。 Y_o の値は Pirt²⁾によれば $1/Y_{x/s}$ ($Y_{x/s}$ は基質に対する菌体収率)と $1/\mu$ とのプロットによって求められるとされているが、嫌気条件下での酵母の連続培養は定常状態が得難く、信頼できる値がえられなかった。一方、回分培養での菌体収率は比較的簡単に 0.10~0.12 g/g-glucose の値が得られる。そこで Y_o の値は 0.12 よりも若干大きく

かつ 0.15 をこえないものと推定すれば α の値は ($Y_{p/s}$ を 0.5 g/g として) 約 0.3~0.42 と推定される。

次に ν_m の値はワールブルグ検圧法で 2~3 の醸造用酵母およびパン酵母の resting cell (培地は麴エキスおよび合成培地⁵⁾)の Q_{CO_2} の値が酵母の種類および前培養条件にほとんど影響なく 200~300 ml- CO_2 /g-dry cell/hr の値を示すことからその平均値 250 (ν_m の次元に直すと約 0.5 hr⁻¹)の近辺にあるものと考えた。

また、 ν_m の値は清酒醪の後半(酵母の増殖停止後)の醱酵能がエタノールによる生産物阻害によってあらわされること^{6,7)}と関連ずけてみると増殖期間においてもエタノールの阻害が存在するものと考えられるので次式⁸⁻⁷⁾が成立するものと仮定した。

$$\nu_m = \nu_{mo} e^{-k_2 p} \quad (7)$$

ただし ν_{mo} はエタノールが存在しない場合の resting cell の醱酵能で、 Q_{CO_2} から先ほど推定した ν_m の値がこれに相当する。 k_2 の値は清酒モロミ⁷⁾およびシウチュウモロミ⁸⁾について得られた値、0.1%⁻¹=0.0127 l/g が使えるものと考えた。(7)式を(1)式に代入すると、

$$\frac{dp}{dt} = \alpha \mu X + \nu_{mo} e^{-k_2 p} X \quad (8)$$

酵母の増殖曲線を時間 t の関数で近似したもの、およびそれを時間で微分したもの $dX/dt (= \mu X)$ をそれぞれ(8)式に代入し p の初期値を与えて積分すれば最初に与えた菌体増殖曲線に対応するエタノール増加曲線が得られる。

増殖曲線は前報⁹⁾に従って Lagrange の補間式によって時間 t の 3 次式で近似した。精度を上げるために全区間を数個に分割し、1 区分の終点を次の区間の始点とした。

Fig. 1 および Fig. 2 は酵母エキスを含む合成培地中での呼吸欠損酵母の回分醱酵経過⁵⁾について $\alpha=3.5$, $\nu_{mo}=0.5$ hr⁻¹と仮定して上記の計算を行なったものである。菌体増殖経過はデータ間を通る実線通りに近似し、得られた p の曲線は破線で示した。Fig. 1 の中で塗り潰したデータポイントは計算の都合で補足したものである。

Fig. 1 の実験は酵母エキスを 2 g/l 含む合成培地で、pH=4.0, 30°C の培養経過であるが、Fig. 2 はこれに酵母エキスを増量して 30 g/l として栄養条件をよくして嫌気培養としては異常な値まで菌体が増加(乾物重量で 13 g/l)し、エタノールも増殖期間中で 60 g/l

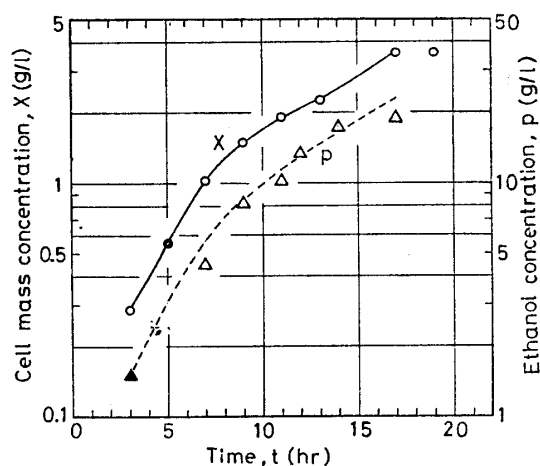


Fig. 1. Calculation of ethanol production in a batch fermentation. The calculated value of ethanol(---) was obtained by Eq. (8), in which the cell mass was stimulated(—) from the observed value($\circ$). Points in open triangle are the observed ethanol concentrations. The value of α was chosen arbitrarily as 3.5 and ν_{mo} as 0.5 hr^{-1} . The experimental data were taken from the literature.⁵⁾ The data points shown in filled circle and filled triangle were assumed values for the calculations.

に達している例である。Fig. 1 では計算値は実測したエタノール増加とよく一致しているが、Fig. 2 では計算値は実測値を上回る傾向を示している。この不一致の検討は後に行なうこととしFig. 3 は特殊な回分醗酵

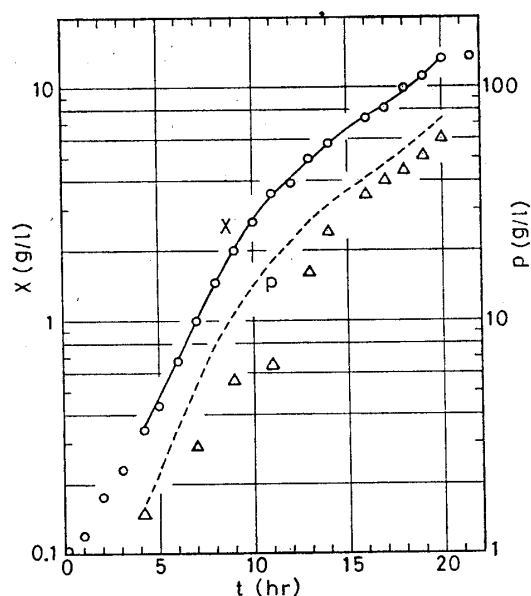


Fig. 2. Calculation of ethanol production as compared with the experimental result of a batch fermentation in enriched medium.⁵⁾ For details cf. Fig. 1.

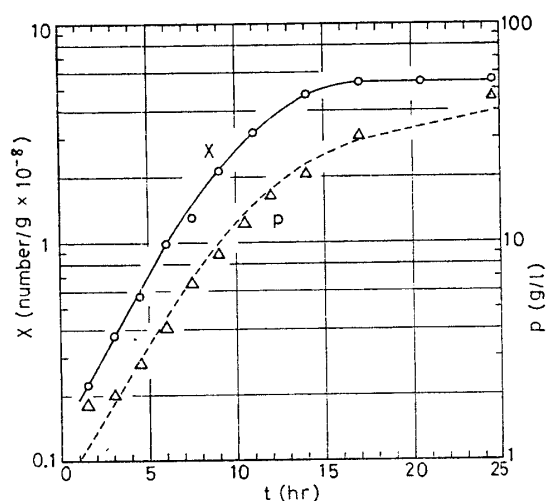


Fig. 3. Prediction of ethanol production in a *shōchū* mash fermentation. The medium was saccharified *shōchū* koji (*Aspergillus kawachii* grown on steamed rice), the pH value of the medium was 3.1, and the temperature was set at 25°C . For further explanation, cf. Fig. 1.

例としてしょうちゅうモロミについての計算結果を示した。この実験に用いた培地はしょうちゅうコウジをメスシリンダーで 500 ml 採り、水を 700 ml 加え、 55°C で2時間糖化したのちクエン酸で pH を 3.1 に調整したもので、pH が低いこととコウジの残骸が大量に混在していることが特徴で実際のモロミに近いものである。酵母密度は顕鏡法で数計したもので、便宜上 $10^8 \text{ cell} = 0.8 \text{ mg-dry cell mass}$ として計算した結果を示す。またこの実験は 25°C で行なったものであるが ν_{mo} の値 (30°C での測定値に基づく) に対する温度補正は省略した。 α の値は 3.5, ν_{mo} の値は 0.5 hr^{-1} を用いた。この計算結果は実測値とよく一致していると見てよいであろう。

Fig. 2 における計算値と実測値の若干の不一致の原因の検討とあわせて、計算結果に及ぼす α および ν_{mo} の値の変動の影響を調べたのが Fig. 4-a および Fig. 4-b である。両図とも Fig. 2 に示した菌体増殖曲線およびエタノール初期値はそのままにし、Fig. 4-a では $\nu_{mo} = 0.25 \text{ hr}^{-1}$ の一定値に対して α の値を図に示すように 0.25~0.45 の範囲で変動させたもの、Fig. 4-b は $\alpha = 3.5$ の一定値に対して ν_{mo} を $0 \sim 0.5 \text{ hr}^{-1}$ まで変えた場合の解の形を比較したもので、参考のためにエタノールの測定値を記入してある。

Fig. 4-a および Fig. 4-b の結果から、 α の幅として約 1, ν_{mo} の幅 0.2 がおおそ実測値の測定誤差に見合っているようである。このことと先に推定した α の領域、 ν_{mo} の推定値および Fig. 1~Fig. 3 までの結

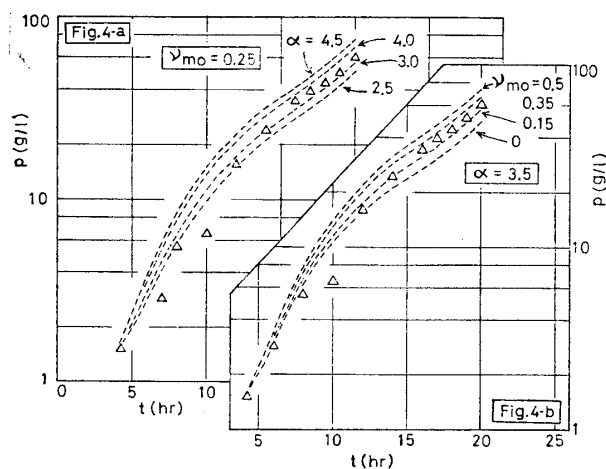


Fig. 4-a. Effect of the fluctuation of the α value on the ethanol production. The ν_{mo} value was arbitrarily fixed at 0.25 hr^{-1} and the α value was changed as shown in the figure. The growth curve and the initial ethanol concentration in Fig. 2 were employed in this calculation. The data (p values) in the figure were also transcribed from Fig. 2 for reference.

Fig. 4-b. Effect of the fluctuation of the ν_{mo} value on the ethanol production. The α value was chosen as 3.5 (—) and the ν_{mo} was varied. The other conditions are the same as in Fig. 4-a.

果を総合して α の値は 3.5 近辺, ν_{mo} は 0.5 近辺に定めるならば酵母の増殖曲線から対応するエタノール増加曲線をかなり良い精度で予測し得られるものと考えられる。

また Fig. 3 に示すようにこの方法は酵母の増殖期から静止期に至る全醗酵期間に適用でき, すでに報告⁷⁾した清酒モロミ後半におけるエタノール増加速度式を包含するので清酒醸造工程の解析, 工程設計に利用できるものと考えられる。

Nomenclature

k_2 : empirical constant, l/g
 p : ethanol concentration, g/l
 t : time, hr

X : cell mass concentration, g/l , cell number concentration, l/g

Y_θ : $(= \Delta X / \Delta S_\theta)$ maximum growth yield, g/g

$Y_{p/s}$: yield coefficient of ethanol, g/g

$Y_{x/s}$: yield coefficient of cell mass, g/g

α : constant $(= Y_{p/s} / Y_\theta)$, (dimensionless)

ΔS_t : total amount of glucose assimilated, g/l

ΔS_g : amount of glucose used for energy production for growth, g/l

ΔS_m : amount of glucose used for energy supply of maintenance, g/l

μ : specific growth rate, $1/hr$

ν : specific rate of ethanol production, $1/hr$

ν_m : specific rate of ethanol production of resting yeast cells, $1/hr$

ν_{mo} : ν_m at $p=0$, $1/hr$

しょうちゅう醗中の酵母の増殖およびエタノール生成を測定された久芳良則氏（現在熊本県酒造研究所）に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Luedeking, R., Piret, E. L. : *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, **1**, 393 (1959).
- 2) Pirt, S. J. : *Proc. Roy. Soc. B*, **163**, 224 (1962).
- 3) van Uden, A. : *Arch. Mikrobiol.*, **58**, 145 (1967).
- 4) van Uden, A. : *Arch. Mikrobiol.*, **62**, 34 (1968).
- 5) Nagatani, M., Shoda, M., Aiba, S. : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 241 (1968).
- 6) Aiba, S., Shoda, M., Nagatani, M. : *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 845 (1968).
- 7) Aiba, S., Shoda, M., Nagatani, M. : *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1285 (1969).
- 8) Nagatani, M., Kuba, Y., Sugama, S. : *J. Ferment. Technol.*, **47**, 723 (1969).
- 9) 永谷 : 醸工誌, **51**, 35 (1973).

(昭47.11.7 受付)