

〔醸工 第42巻, 第4号, p. 239~245, 1964〕

アルコール醱酵における酵母の増殖について

秋葉 眺彦・富金原 孝

(理化学研究所)

Kinetics of Growing Yeast in Grain Alcohol Fermentation

Teruhiko Akiba and Takashi Fukinbara

(The Institute of Physical and Chemical Research Tokyos.)

On the growth of yeast in grain alcohol fermentation using saccharified corn mash as a medium, the following equation can be set up.

$$N = \frac{N_0 N_m / (N_m - N_0)}{e^{-at} + N_0 / (N_m - N_0)} \quad (6)$$

Experiments have proved the equation holds true and the value of a in the equation was determined by graphical and analytical methods.

The fermentation was conducted in corn mash with sugar in different concentrations at 23°. And the effect of the initial sugar concentration on the maximal growth of yeast was investigated. As the results of the experiments, the following equation was set up.

$$N_m - N_0 = K(C_0 - C_r)^s \quad (13)$$

From these equations described above, a growth curve of yeast in grain alcohol fermentation can be easily obtained when the inoculum size (N_0) and the initial sugar concentration (C_0) were given.

The other examples of yeast growing in the alcohol fermentation with different media also proved to satisfy the above equation (6). Yield value of yeast (equation 14) was found to be a function of the initial sugar concentration in the fermentation (equation 15).

結 言

培養菌体の増殖は一般に lag phase, logarithmic phase, stationary phase を経過するが、この増殖曲線は種々の培養条件によって異なる様相を呈する。培養条件は化学的条件と物理的条件に大別できる。同一培地の微生物培養において物理的条件を一定にした場合、制限因子となる基質の濃度によって増殖最高菌体量は異なってくるが、菌体増殖の時間的経過にはある一定の関係が存在すると考えられ、したがってそれを数式によって表すことも可能である。

文献上にみられる菌増殖に関する数式には、途中の変化をも含めた増殖全体を表すものは少い。そこで筆者らは増殖の phase に関係なく、それを含めて培養系全体を通して菌増殖を表わしうる数式を検討解析した。実験の結果数式の成立することを認めたので報告する。

本報では特にとうもろこしを原料とするアルコール醱酵における酵母増殖の場合について検討した。

酵母増殖に関する数式

酵母の増殖速度はそのときに存在する菌体数の関数であるとすれば、次式によって示される。

$$\frac{dN}{dt} = F(N) \quad (1)$$

これを Taylor 展開して

$$\frac{dN}{dt} = F(N) = C + aN + bN^2 + cN^3 + \dots \quad (2)^{1)}$$

$N=0$ のとき $C=0$ であり、また第四項以下を略してしまおうと。

$$\frac{dN}{dt} = aN + bN^2 \quad (3)$$

この式は $b=0$ のとき logarithmic phase を示す式となる。(3) 式を $t=0$ のとき $N=N_0$ の初期条件で積分し、 N について整理すると、

$$N = \frac{1}{(1/N_0 + b/a)e^{-at} - b/a} \quad (4)$$

この式で $t=\infty$ のとき $N=N_m$ とすれば

$$N_m = -\frac{a}{b} \quad (5)$$

をえる。これを (4) 式に代入する。

$$N = \frac{N_0 N_m / (N_m - N_0)}{e^{-at} + N_0 / (N_m - N_0)} \quad (6)$$

$N_m \gg N_0$ とすると、

$$N = \frac{N_0 N_m}{N_m e^{-at} + N_0} \quad (7)$$

但し N : concentration of yeast cell [cells/ml]

N_0 : inoculum size [cells/ml]

N_m : maximal concentration of yeast cell [cells/ml]

t : time [hr]

a, b : constant

酵母増殖に関して (6) 式, (7) 式が適用されるとき、定数 a および最高菌濃度 N_m を決めておけば、接種菌濃度 N_0 で発酵を開始した場合の酵母増殖の時間変化を表わすことができる。

a の決定法

I. グラフによる方法

(6), (7) 式はそれぞれ次のようにかきかえる。

$$\frac{N_0(N_m - N)}{N(N_m - N_0)} = e^{-at} \quad (8)$$

$$N_0 \left(\frac{1}{N} - \frac{1}{N_m} \right) = e^{-at} \quad (9)$$

両式の左辺を実験値より計算し、時間に対して半対数グラフ上にプロットすれば直線を与える。直線の勾配は a である。

II. 計算による方法

(6) 式において N_0 , N_m はある培養系では一定値を示すから

$$\frac{N_0}{N_m - N_0} = R$$

とおくと, (6) 式は次のような酵素反応速度式と同型の式になる.

$$N = N_m \cdot \frac{R}{e^{-at} + R} \quad (10)$$

ここで $N = \frac{N_m}{2}$ のときの時間を $t = t^*$ とすると

$$R = e^{-at^*} = \frac{N_0}{N_m - N_0} \quad (11)$$

したがって次式により a を計算できる.

$$a = \frac{2.303}{t^*} \log \frac{N_m - N_0}{N_0} \quad (12)$$

以上の二つの方法により (6) 式中の a を決定できる.

 N_m の 決 定

最高菌体濃度 N_m は基質初濃度, pH 変化, 代謝生産物の蓄積その他の条件の影響をうけ, ある醸酵条件では一定の値を示す^{2), 3)}. N_m が pH 変化, 代謝生産物の蓄積による影響をうけず, 培地中の特定基質濃度だけによって規制される場合の基質濃度と菌濃度については, 2, 3 の関係式がみられる^{4), 5)}. いずれも基質濃度が非常に小さい範囲の関係であり, 筆者らは高濃度のとうもろこし糖化液の場合について検討した.

糖初濃度を高い範囲で変えた, とうもろこし糖化液でアルコール醸酵をおこなった場合の消費糖と N_m との関係調べた結果, 次の実験式を得た (実験結果は後述)

$$N_m - N_0 = K(C_0 - C_r)^S \quad (13)$$

但し C_0 : initial concentration of substrate (glucose) [g/100ml]

C_r : concentration of residual substrate

K, S : constant

定数 K, S は (13) 式の全対数グラフ上の直線から, それぞれの截片, 勾配として求められる.

$C_r \cong 0$ とすれば, 以上の (6) 又は (7) 式および (13) 式とから醸酵の初発条件 N_0, C_0 を知れば任意の時間 t における菌濃度 N がわかり, 増殖曲線は容易にかくことができる.

実験および考察

I. とうもろこしの糖化

実験に用いた原料とうもろこしはローデシア産の全糖 70.23% および 73.26% のものである.

とうもろこしの糖化は高濃度仕込を目的としたが, そのためには高圧長時間の蒸煮条件を必要とし, それは実験室的には困難なので, 蒸煮は一応 3 kg, 60 min とし, 糖化は液体麴によって 50°C, 48 hr おこなうことを基本的条件として糖化法を検討した.

現在アルコール醸酵の澱粉質原料の高濃度仕込には, バクテリア・アミラーゼを使用する方法⁶⁾, 仕込水に塩酸を加える方法⁷⁾ などの報告がみられるが, 筆者らはとうもろこしの粉碎度, バクテリア・アミラーゼの使用および仕込水に塩酸を加える方法などについて種々検討の結果, 次のような蒸煮および糖化条件が澱粉溶出歩合, 糖化率のよいことを認めた.

蒸 煮 条 件					
粉 碎 度 (mesh)	全 糖 (%)	仕込水塩酸濃度 (%)	pH	蒸 煮	蒸 煮 醪 pH
20~40	20	0.05	3.8	3 kg-60 min	4.5

糖 化 条 件		
液 体 麹 (対とうもろこし重量%)	pH	糖 化
30	4.5	50°C-48 hr

以上の蒸煮糖化条件により全糖 20% の高濃度仕込で澱粉溶出歩合, 糖化率とも 90% 近い高率をえた。また塩酸を仕込水に加えることにより蒸煮後の pH 4.5 となり, 糖化の際に pH の調節の必要がなく, また酵素液化に比較して窒素の溶出量が多いことを認めた。

なお糖化に使用した液体麹は, 当研究室で *Asp. awamori var fumus* に Co^{60} 照射してえた変異菌 (B-42)⁸⁾ を 30°C, 72 hr 液内培養してえられる酵素液である⁹⁾。

II. とうもろこし糖化液のアルコール醱酵における酵母増殖

糖化終了したとうもろこし醪から濾過により糖化液をとり, 希釈後そのまま醱酵にうつした。醱酵は 5 l 容のガラス製密閉ジャーを使い, 温度 23°C, 攪拌 200 rpm 通気は全くおこなわないで嫌気的条件下でおこなった。使用菌株は協会 6 号清酒酵母である。この条件でアルコール醱酵をおこなった場合の酵母の増殖について数式の検討をした。

糖初濃度 $C_0 = 17.69$ (g/100 ml) のとうもろこし糖化液に接種量 $N_0 = 0.5 \times 10^6$ [cells/ml] で醱酵を開始した。そのときの酵母菌体数の増加, 消費糖の変化は Fig. 1 に示した。この実験値を用いて, $N_m \gg N_0$ の場合

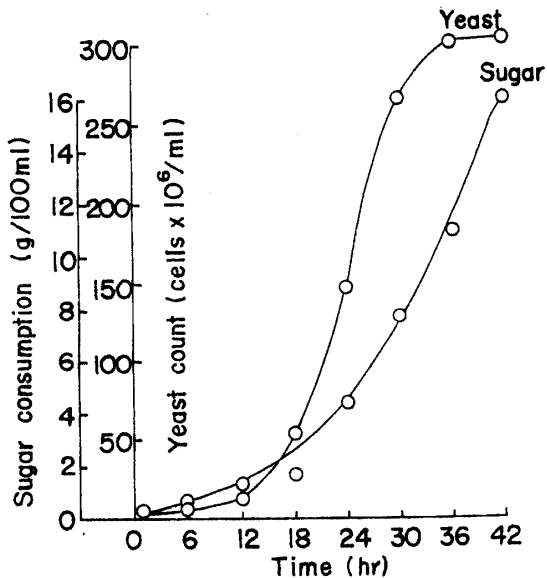


Fig. 1. Time-course of the grain alcohol fermentation with the media of saccharified corn mash ($C_0 = 17.69$)

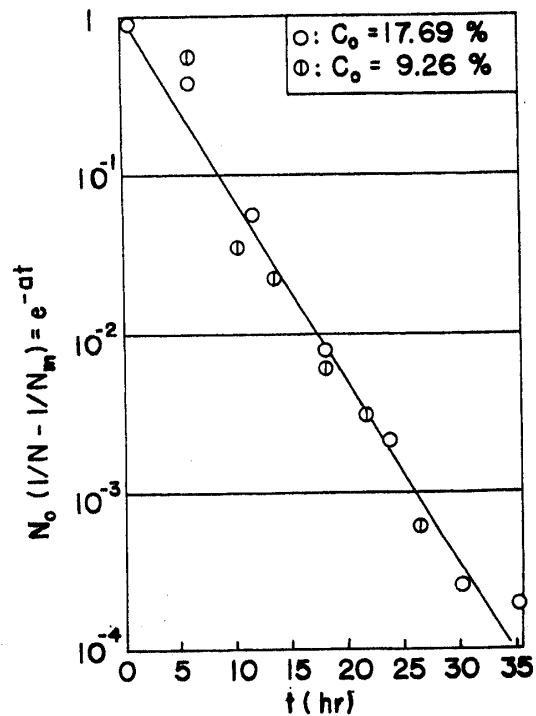


Fig. 2. Determination of the value of a in the equation (6) by graphical method

の(9)式を計算した結果, Fig. 2 に示す直線をえ, 数式の成立することを認めた. なお N_m の値として, 培地中の糖が消費されて残糖がほとんどなくなったときの菌体濃度 $N_m=304.0 \times 10^6$ [cells/ml] を採用して計算したものである.

糖初濃度を変えた場合について調べるため, 同じく $C_0=9.26$ [g/100 ml] のとうもろこし糖化液に $N_0=2.0 \times 10^6$ [cells/ml] の接種量で醗酵を開始した場合の酵母増殖 ($N_m=212.0 \times 10^6$) を, (8) 式について計算した結果えられた直線は, Fig. 2 に示すごとく同一直線になり勾配 a は当然一致し, 糖初濃度に関係なく(8), (9)式の成立が認められた. Fig. 2 から $a=0.27$ の値をえた.

次に(12)式から a の値を計算すると

$C_0=17.69$ の場合	$C_0=9.26$ の場合
$N_0=0.5 \times 10^6$	$N_0=2.0 \times 10^6$
$N_m=304.0 \times 10^6$	$N_m=212.0 \times 10^6$
$t^*=24$ (Fig. 2 参照)	$t^*=17$

これらの値を代入すると, それぞれ $a=0.267$, $a=0.276$ の値がえられ, グラフから求めた値とよく一致する. 次に(13)式に関しては, 次の実験からえられたものである.

とうもろこし糖化液の糖初濃度をその高い範囲でいろいろに変えて, 同じ条件で醗酵した場合の消費糖と N_m との関係を調べた. 醗酵の初期および終期の培地状態を Table 1 に示した. この実験結果から増殖菌体数

Table 1. Initial and final conditions of the mash in the grain alcohol fermentation with different sugar concentration

No.	Initial		Final	
1	C_0 (g/100ml)	22.25	C_r (g/100ml)	2.63
	N_0 ($\times 10^6$ /ml)	2.0	N_m ($\times 10^6$ /ml)	344.0
	pH	4.51	pH	3.59
	T-N (g/100ml)	0.219	T-N (g/100ml)	0.118
2	C_0	19.94	C_r	1.81
	N_0	2.0	N_m	336.0
	pH	4.40	pH	3.60
	T-N	0.180	T-N	0.108
3	C_0	17.69	C_r	1.59
	N_0	0.5	N_m	304.0
	pH	4.57	pH	3.60
	T-N	0.163	T-N	0.097
4	C_0	13.15	C_r	0.97
	N_0	2.0	N_m	264.0
	pH	4.41	pH	3.42
	T-N	0.152	T-N	0.056
5	C_0	9.26	C_r	0.70
	N_0	2.0	N_m	212.0
	pH	4.30	pH	3.10
	T-N	0.073	T-N	0.028
6	C_0	6.21	C_r	0.22
	N_0	1.0	N_m	168.4
	pH	4.40	pH	3.10
	T-N	0.048	T-N	0.015

(T-N : Total-nitrogen)

($N_m - N_0$) と消費糖 ($C_0 - C_r$) との関係は, Fig. 3 に示すごとく直線となり, したがって (13) 式の実験式をえる. 図より $K = 56.0 \times 10^6$, $s = 0.60$ の値がえられた.

(13) 式は糖初濃度 $C_0 = 22.25$ から 6.21 [g/100ml] の範囲の実験からえた実験式であり, この範囲外の糖初濃度での成立はさらに実験を要し, 異なる実験式になることも考えられ, (13) 式はしたがって本実験の範囲内だけで成立するものである.

Ⅲ. 培地の異なるアルコール醱酵の酵母増殖についての計算例

a の値は培地, 醱酵条件などにより異なる値をとると考えられるので, ほかの培地を用いたアルコール醱酵の酵母増殖について(6)式が成立するか, a はどんな値をとるかを検討するため文献値について計算をおこなった.

KCP 消化液に協会 6 号でアルコール醱酵した場合¹⁰⁾ および甘藷の酸加水分解物でアルコール醱酵した場合¹¹⁾ を引用して計算した結果それぞれ Fig. 4 のごとき直線をえ, また a の値は次のように求められた.

培 地	KCP 消化液	甘藷酸加水分解物
グラフより	$a = 0.13$	$a = 0.36$
(12)式より	$a = 0.205$	$a = 0.365$

これらの結果は (6) 式が他の培養系にも使えることを示す例となり, 利用範囲も広いと思われる.

Ⅳ 酵母の収率

酵母の収率 (Yield value) を

$$Y = \frac{N_m - N_0}{C_0 - C_r} \quad (14)$$

と定義すると (13) 式により Y の値は ($C_0 - C_r$) の値によって変る. (13), (14) 式から

$$Y = K(C_0 - C_r)^{s-1} \quad (15)$$

したがって (14) 式から計算される Y の値と ($C_0 - C_r$) との関係は両対数グラフ上で勾配 $s-1 = -0.40$, 截片 $K = 56.0 \times 10^6$ の直線にならなければならない. Fig. 5 に示

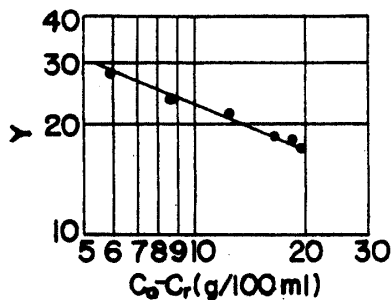


Fig. 5. Relation of the initial sugar concentration (C_0) to the yield value (Y) according to the equation (15)

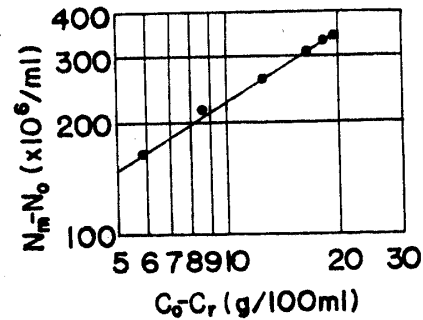


Fig. 3. Effect of the initial sugar concentration (C_0) on the maximal yeast growth ($N_m - N_0$)

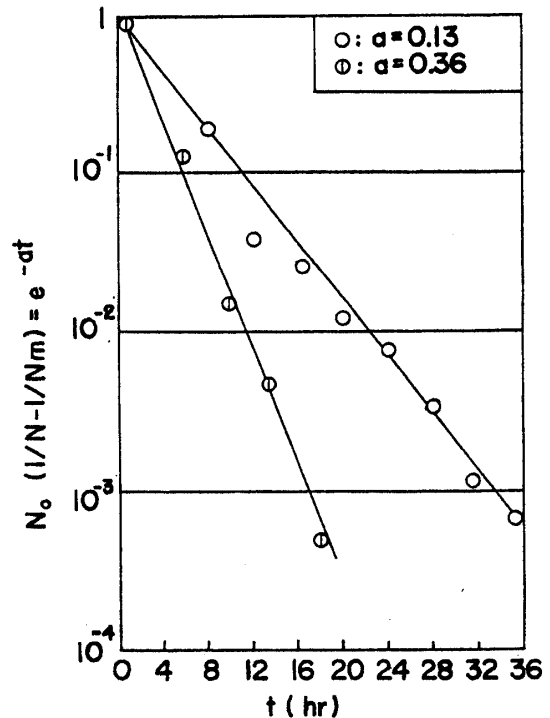


Fig. 4. Determination of the value of a in the alcohol fermentation with different media shown in literatures.

すごとく, (14), (15) 式からえられた直線はこれらを満足する。

要 約

とうもろこしを原料とするアルコール醱酵における酵母の増殖に関する数式を検討した。酵母増殖の時間変化に関して (6) 式を導き、実験の結果その成立することを認め、数式中の定数を決定した。また最高菌濃度と糖初濃度との関係については、実験の結果から (13) 式をえた。この結果とうもろこしのアルコール醱酵において糖初濃度、菌接種量の初期条件さえわかれば、酵母増殖の時間的経過を計算でき増殖曲線を容易にかくことができる。

文献上の他の糖を基質とするアルコール醱酵における酵母増殖について (6) 式の適用を検討した結果、それらについても数式の成立することが認められ定数を決定できた。

この醱酵における酵母収率は糖初濃度により異り、両者の間に (15) 式のような関数関係があることを認めた。

本報は昭和38年度本学会大会生物化学工学シンポジウムで講演した。

文 献

- | | |
|---|---|
| 1) Lotka, A. J. : <i>Element of Mathematical Biology</i> , 65 Dower Publications, Ltd., New York. | 82, 80 (1961). |
| 2) Stainer, R. Y., Doudoroff, M., Adelberg, E. A. : <i>The Microbial World</i> , 2nd Ed, 344. | 6) 松沢, 亀川, 岩崎 : 醸協誌, 19 , 373, 423 (1961). |
| 3) 中馬, 岩坪, 山野, 久保 (共訳) : 生物物理化学, 168 (1960), 共立出版 (株) | 7) 小野, 大宰 : 醸協誌, 10 , 267, 270 (1954). |
| 4) Contois, D. E. : <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 21 , 40 (1959). | 8) 富金原, 黒田 : 合酒技報, 21 , 67 (1960). |
| 5) Ecker, R. E., Lockhart, W. R. : <i>J. Bacteriol.</i> , | 9) 渡部, 富金原 : 合酒技報, 27 , 29 (1962). |
| | 10) 富金原, 黒田 : 合酒技報, 27 , 450 (1962). |
| | 11) 上田 : 農化, 29 , 101 (1955). |
| | (昭 39. 1. 18 受付) |