

酵母によるアルコール発酵作用に関する学生実験の改良

加藤 徳雄, 斎藤 正明

愛媛県立医療技術大学紀要 第4巻 第1号抜刷

2007年12月

酵母によるアルコール発酵作用に関する学生実験の改良

加藤 徳雄*, 斎藤 正明**

Improvement of the Student Experiment on Alcoholic Fermentation by Yeast

Norio KATOH, Masaaki SAITO

序 文

酵母菌によるアルコール発酵は、農業高校の食品系学科や工業高校の化学系学科においては、実習のテーマとして実践されている¹⁾。その多くの場合、500万円以上もする市販のバイオリアクターや数千万円もするアルコール製造プラントによっている。しかし、最近では地方自治体の財政難から高価な実験装置の導入は困難になっている。

そこで、比較的安価な汎用品を用いて手作りで実験用バイオリアクターシステムを試作し、種々の果物ジュースを原料として反応の進行につれて発生する気泡を観察し、匂いの変化をとらえ、さらに上昇するエタノール濃度を定量分析する学生実験を開発した。生成するエタノール濃度は1%未満である。

開発した学生実験は反応の進行による変化が五感で捉えられるので、自然科学を専門としない学生にも興味を持って取り組むことができると思われる。本学学生を対象に実践したので報告する。

方 法

1 酵母の固定化

酵母の固定化とは、酵母菌を水に溶けない柔らかなボール(球体のゲル)の中に閉じ込めることである。ボールをつくる物質はアルギン酸ナトリウムで、昆布など褐色の海藻に含まれている。

- (1) 酵母菌はパンを作るときと同じもので、市販のドライイーストを用いる。ドライイースト14gを水200mlとかけ混ぜ懸濁させる。
- (2) アルギン酸ナトリウム5gを水200mlと加温しながらかくはん棒でかけ混ぜ、半透明のゲル状にする。
- (3) アルギン酸ナトリウム水溶液を冷却し40℃以下とする。これと酵母菌の懸濁液を混合し、かくはん棒でよくかけ混ぜる。
- (4) このアルギン酸ナトリウムと酵母菌の混合液を、マイクロチューブポンプにより、3%塩化カルシウム水溶液表面に一滴一滴落下させる。このとき塩化カルシウム水

溶液をマグネチックスタラーでゆっくりかくはんする。一滴一滴、落ちた瞬間にアルギン酸ナトリウムは直ちにカルシウムイオンと反応し半透明の球体になり、同時に酵母を閉じ込める。この酵母を閉じ込めた球体をアルギン酸ボールと呼ぶ。アルギン酸ボールの直径は3~4mmで、柔らかくスポンジのような手ざわりがする。

- (5) 適当な量のアルギン酸ボールができれば、ガラスフィルターでろ過する。ろ液は回収し、繰り返し利用する。
- (6) ガラスフィルター上のアルギン酸ボールを純水で3回以上繰り返し洗浄する。
- (7) 洗浄したアルギン酸ボールを純水とともにバイオリアクター本体に注ぎ込みアルギン酸ボールで満たす。
- (8) バイオリアクター本体に充てんされたアルギン酸ボールを純水約300ml以上で洗浄する。純水で繰り返し洗浄するのは、塩化物イオンを除くためである。

2 バイオリアクターシステムの試作

手作りで試作したバイオリアクターシステムは、3種あり、充てん層型2種(循環型と連続型)とかくはん層型1種である。

(1) 充てん層型バイオリアクター

充てん層型(循環型)を写真1に、充てん層型(連続型)の概略を図1に示した。循環型は、固定化した酵母にポンプで原料を送り、繰り返し酵母と原料を接触させることができる。一方、連続型は原料を循環させるのではなく、バイオリアクター本体を通過するのが1回だけで、エタノールを含むジュースを連続的に取り出すことができる。

バイオリアクター本体はウォータージャケットを持つ円筒であり、温度一定の水を循環させた。下部に円盤状のガラスフィルター(G1)を設け、上部にはボールによる閉塞やボールの通り抜けを防ぐため、ガラスボールフィルター(G1)を設置した。本体の容量は約140mlであり、本体の内径2.2cm、全長47cmである。

原料は果汁100%のジュースとし、これをマイクロチューブポンプにより一定の流速でバイオリアクター本体に送る。バイオリアクター本体内の酵母とブドウ

*愛媛県立医療技術大学保健科学部看護学科

**東京都立産業技術研究センター

糖が接触し、次式のようにブドウ糖がエタノールと二酸化炭素に変換される。



(2) かくはん層型バイオリアクター

充てん層型と比較することをねらいとして、従来のバッチ式でアルギン酸ボールと原料を混合しかくはんさせるタイプのかくはん層型を試作した。この装置を写真2に示した。バイオリアクター本体はウォータージャケットを持ち、容量は約500mlである。

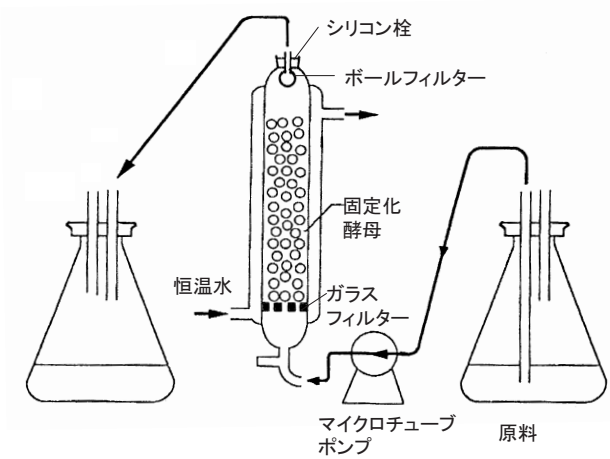


図1 充てん層型バイオリアクター（連続型）



写真2 かくはん層型バイオリアクター

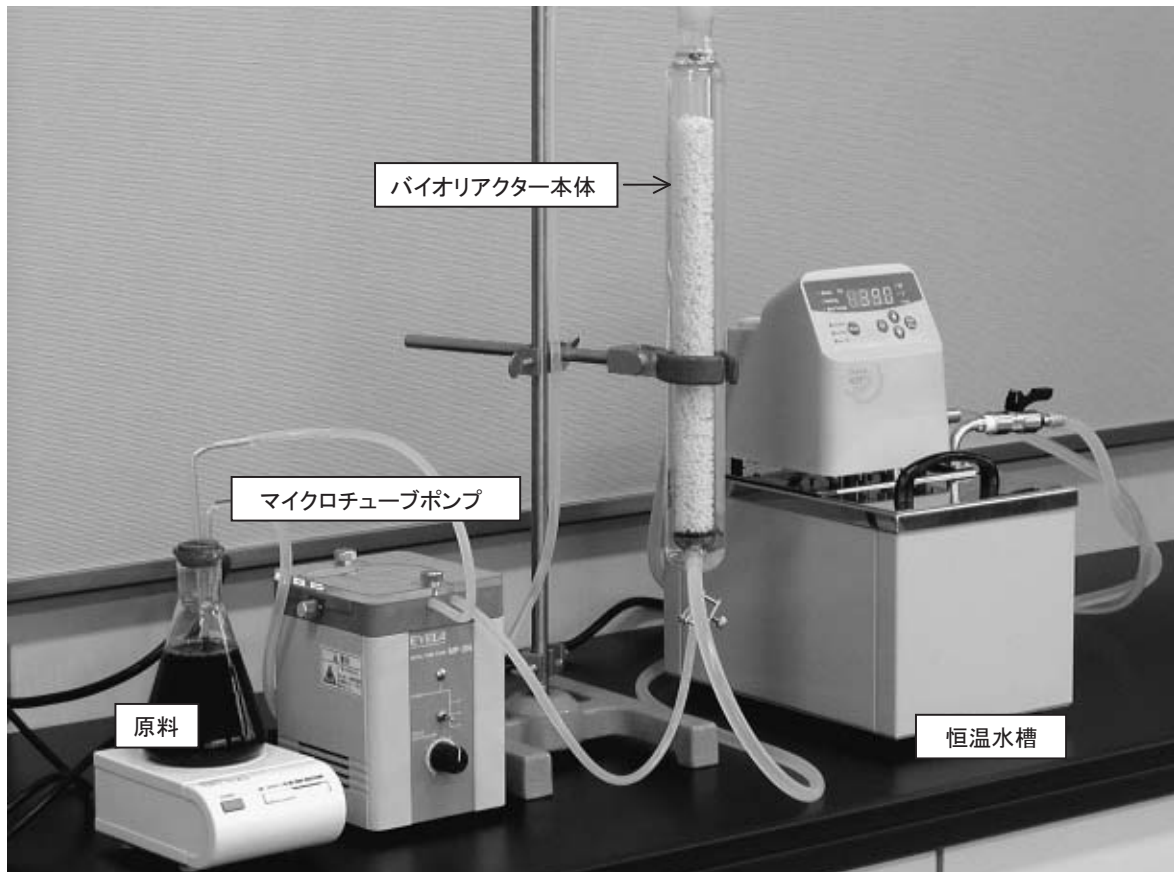


写真1 充てん層型バイオリアクター（循環型）

3 エタノールの分析法

ジュース中のエタノールの定量は、ガスクロマトグラフィーにより行った。分析条件は下記の通りとした。

ガスクロマトグラフ：島津製作所製 GC-14B，カラム：SHINCARBON A 60/80，カラム温度：120℃，検出器：水素炎イオン化検出器（FID），キャリアーガス：ヘリウム（He），試料注入量：1 μ l

エタノール標準溶液（0.5, 1.0, 5.0 vol %）の調製は特級試薬を用い、純水で希釈した。

実験結果および考察

1 バイオリアクターシステムの比較

(1) 充てん層型バイオリアクター（循環型）

温度39℃と流速毎分10m ℓ の最適条件²⁾で、原料の100%ぶどうジュース250m ℓ を繰り返しバイオリアクター本体に循環させた。開始から20分ほどすると、エタノールの匂いが認められ、二酸化炭素の気泡が活発に発生するのが観察される。気泡の発生している状態を写真3に示した。10分間隔で三角フラスコからサンプリングし、直ちにガスクロマトグラフィーにより分析した。結果の一例を図2に示した。

酵母のアルコール発酵作用により、二酸化炭素の気

泡の発生およびエタノールの匂いを認め、さらにエタノールの増加を確認するためには、約40分の運転で十分であることが明らかになった。

(2) かくはん層型バイオリアクター

原料の容量は400m ℓ として、原料とアルギン酸ボールの体積比を充てん層型の場合と同じにした。温度は最適の39℃、かくはん速度は約200rpmとした。

原料中にアルギン酸ボールが均一に分散し流動していれば、酵母とブドウ糖の接触も多くなり反応が進むと考えられる。ところが約30分以降はアルギン酸ボールが浮いて、均一なかくはんができなくなる。この状態を写真4に示した。ボールが浮く原因はアルコール発酵反応によりボール内で二酸化炭素が発生するためと考えられる。

均一なかくはんを維持するため、浮いたボールを下方に流動させるように、形状の異なる3種類のかくはん用羽根を用いて効果的なかくはん条件を検討した。その結果、一種類の羽根を単独で使用するよりも二種の羽根を組み合わせるにより、著しくかくはんが改善された。

エタノール濃度の変化を図2に示した。エタノール濃度は循環型による場合とほぼ同じであった。循環型の場合と同様運転時間は40分で十分であった。

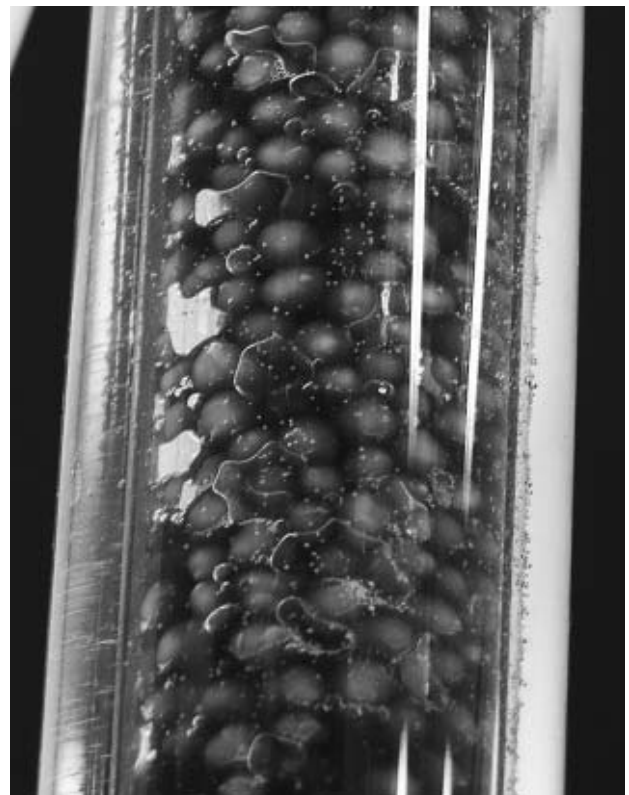
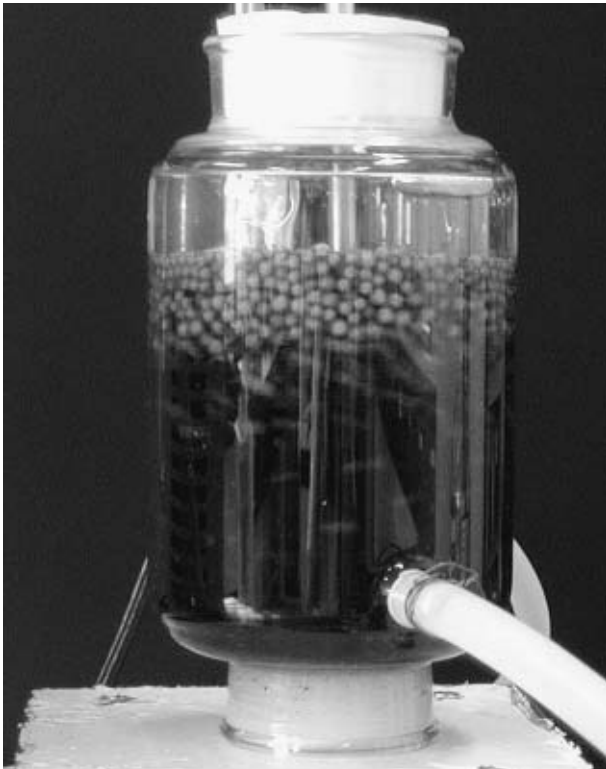


写真3 バイオリアクター内で発生する気泡（充てん槽型）



(a) 浮いている状態



(b) 浮く前の状態

写真4 浮いているアルギン酸ボール

(3) 充てん層型バイオリアクター（連続型）

連続型（図1）では、原料を循環させないので流速によりエタノール濃度は大きく異なるが、流速が毎分10ml、温度39℃の場合の結果の一例を図2に示した。図2では開始から45分以降は示していないが、エタノール濃度は45分以降上昇せずほぼ一定になった。

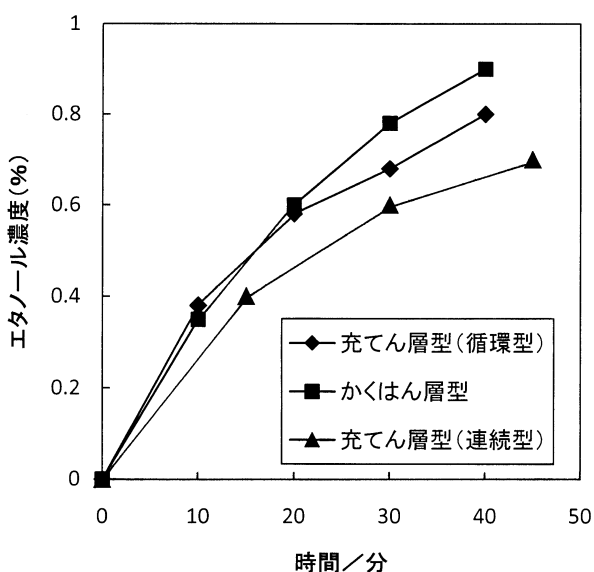


図2 エタノールの濃度変化

この条件で繰り返し実験すると45分以降のエタノール濃度は0.6%~0.9%の範囲で変動した。この原因は酵母の活性が変動するためと考えられる。酵母の活性は、アルギン酸ボールの作り方、保存の方法、ブドウ糖の供給の仕方などにより変動するようである。

2 充てん層型とかくはん層型の比較

充てん層型の欠点はアルギン酸ボールの繰り返し使用時間が約6時間を超えると、膨潤し直径が約2倍にもなるために、バイオリアクター本体内で閉塞状態になり液の圧力が上昇し、シリコン栓がはずれることである。

かくはん層型では運転時間が30分を超えるとアルギン酸ボールが浮くために原料とボールの流動がやや不十分となる。これを改善するため、羽根の回転数を上げると、アルギン酸ボールがすりきれてしまうという欠点がある。どちらの型でもアルギン酸ボールを保存し、何度も繰り返し使うことはむずかしいことが分かった。

また、3つのタイプのバイオリアクターを40分運転したときのエタノール濃度はほぼ同じであった。

3 原料のpHの影響

原料の果汁100%のぶどうジュースは弱酸性であるので、炭酸水素ナトリウムを加えて酵母の最適pH約7に調整した。その結果、酵母の活性は高くなり、二酸化炭

素が激しく発生するために本体内部の圧力が上昇し、シリコン栓がはずれアルギン酸ボールが飛び散ることがあった。また、ぶどうジュースの色も不自然な色に変わったので、pHを調整しないこととした。

4 学生実習のポイント

学生実験では、充てん層型バイオリアクター（循環型）を採用した。充てん層型は、かくはん層型に比べて操作性および経済性に優れている。実施に当たって下記の点に注意した。

- (1) エタノールの生成に最も影響するのは、充てん層型やかくはん層型という酵母と原料の接触のさせ方より、むしろ酵母の活性であると考えられる。酵母の活性は、アルギン酸ボールの調製の仕方やその履歴などにより異なり、そのため生成するエタノール濃度は変動すると考えられる。固定化した酵母を長期に冷蔵保存した場合や雑菌が発生した場合は、活性は低いようである。したがってアルギン酸ボールは使用の都度調製するのが良い。短期間保存するときは冷蔵する必要がある。
- (2) 原料中のブドウ糖濃度が低い場合は明らかに酵母菌の活性が低い。市販果汁ジュースを用いるときには果汁100%と表示されているものが望ましい。ジュース中に粒子が多い場合には、充てん層型では閉塞の原因となるのでろ過をする必要がある。
- (3) ガスクロマトグラフィーが使用できない場合は糖度計などで屈折率を測定し、ブドウ糖の減少傾向を測定することができる。
- (4) 本実験に要する授業時間は、90分授業が少なくとも2回必要である。その作業内容は、1回目に酵母の固定化・バイオリアクター本体への充てん、2回目にバイオリアクターの運転・エタノールの定量である。

ま と め

酵母のアルコール発酵作用を効果的に観測するためのバイオリアクターシステムを開発した。充てん層型（循環型と連続型）およびかくはん層型のバイオリアクターシステムを手作りで試作し比較した。生成したエタノールはガスクロマトグラフィーにより迅速に定量し濃度の上昇を確認した。最適運転条件で100%ぶどうジュースを原料とした場合には、充てん層型（循環型）およびかくはん層型ともに気泡の発生およびエタノールの匂いを認め、さらにエタノール濃度の増加を確認するためには、約40分の運転で十分であった。また、充てん層型（連続型）では、開始から45分以降エタノール濃度がほぼ一定（0.6～0.9%）になった。実験の操作性と経済性から学生実験には充てん層型（循環型）が適していることが明

らかになった。

本実験に対する学生の反応は概ね良好であった。その主な理由は本実験には驚きを感じさせるいろいろな変化がある。一つはアルギン酸ボール生成の変化の瞬間である。楽しそうに見つめる学生が多い。反応の進行による変化が気泡の発生によって捉えられ、さらにエタノールの匂いの発生により、五感で変化が捉えられる。いろいろな変化に驚きを感じることで学生の化学への興味・関心を高め、自然科学的思考につなげることができると考える。

さらに本実験は種々の身近な素材を実験材料として、応用・発展させることができる。本実験の原料を学生に選択させたり、地方特産の果物を用いることができる。また、酵母菌の顕微鏡観察やガスクロマトグラフィーによる分析の応用などへ発展させることも可能であることから学生実験として有効であると考えられる。

引用文献

- 1) 古川仁朗, 三位正洋, 鎌田 博(1997): バイオリアクター, 「生物工学基礎」, pp.163-186, 実教出版
- 2) 加藤徳雄(2001): 手作りバイオリアクターによるワインづくり, 日本工業化学教育研究会誌, 25, 2-7.

要 旨

酵母によるアルコール発酵作用についての学生実験に適したバイオリアクターシステムを開発した。果物ジュースに含まれるブドウ糖をアルギン酸で固定化した酵母によりエタノールに変換するため、充てん層型（循環型と連続型）およびかくはん層型のバイオリアクターシステムを手作りで試作した。バイオリアクターの最適条件で100%ぶどうジュースを原料とした場合には、充てん層型（循環型）およびかくはん層型ともに二酸化炭素の気泡の発生およびエタノールの匂いを認め、さらにエタノール濃度の増加を確認するためには、約40分の運転で十分であった。また、充てん層型（連続型）では、開始から45分以降エタノール濃度がほぼ一定（0.6～0.9%）になった。実験の操作性と経済性から学生実験には充てん層型（循環型）が適しており、授業での実験のポイントを記載した。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金奨励研究（課題番号10919009および14919013）の助成研究であることを付記し、この場を借りて感謝の意を表します。