廃糖蜜を主原料とした醗酵生産培地に
およぼす γ 線照射の影響

東京大学・応微研

飯塚 広

原子力研究所・高崎研

柴部禎巳・伊藤 均

Effect of Gamma Irradiation on Fermentation Medium
Consisting Mainly of Cane Molasses

Hiroshi IIZUKA*, Sadami SHIBABE* and Hitoshi ITO**

* Institute of Applied Microbiology, University
of Tokyo, Tokyo, Japan

** Japan Atomic Energy Research Institute, Takasaki
Radiation Chemistry Research Establishment,
Takasaki, Japan

Summary

The applicability of radiopasteurization method to fermentation media consisted mainly of molasses was investigated. It was found that γ -radiation had an excellent pasteurization effect on the fermentation media and an increasing effect of ethanol fermentation rate and ethanol yield on the irradiated mashes. Per cent survivals in molasses decreased to *ca.* 70% with heating at 80°C for 30 min, to *ca.* 10% with irradiation by 3.0×10^5 R and to *ca.* 1% by 6.0×10^5 R (Table 2). The irradiated mashes were suitable for media of the "starter", since the rate and the degree of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in irradiated mashes did not differ from the growth in heat-pasteurized mashes (Fig. 2). In case of the molasses mashes added nitrogen sources, ethanol fermentation rate and yield in irradiated mashes were larger than those in heated mashes (Figs. 3 and 4). Besides, a 14% difference was seen between fermentation yield in mashes irradiated by 3.0×10^5 R and that in mashes heated at 80°C when no nitrogen sources were added to the mashes (Fig. 4). In the dose range between 1.0×10^5 and 9.5×10^5 R, the concentrations of total sugar and direct reducing sugar, pH (Fig. 5), and optical density of molasses were little affected by radiation.

はじめに

放射線殺菌法はディスプレイな医療・衛生材料を対象に、また食品保存を目的として広く知られてきている。この放射線殺菌法は生物化学工業の分野ではまだ利用されるに至っていない。従来、醗酵生産培地の殺菌は常圧下または加圧下において加熱法により行なわれている。加熱処理法で問題となる一つは高温の生産培地を過温まで冷却する工程であり、多量の冷却水、時間を要する点である。また高温処理による培地基質の変成も問題である。放射線殺菌法がこの系に適用できれば、常温下の処理であるため上記の問題の解消に役立つであろう。

本研究では、 γ 線放射線殺菌法が醗酵生産培地に適用できるかどうか、また照射処理培地が醗酵生産に適しているかどうかの検討を行なった。使用した培地は廃糖蜜を主原料としたものであり、醗酵生産菌にはアルコール酵母を用いた。従来法の加熱法と放射線照射法により培地の処理を行ない、酵母の増殖度およびアルコール生産量などについて比較検討を行なった。

試料および実験方法

1. 廃糖蜜

使用した廃糖蜜はフィリピン産のもので、全糖分58.2 wt%, 直接還元糖24.6 wt% (各、転化糖として)、灰分6.1 wt%, 水分28.3 wt% を含むものである。廃糖蜜試料の糖分、水分などの分析は常法¹⁾にしたがった。

2. 放射線殺菌効果の判定

廃糖蜜50 gに硫酸0.2 gを加え、全容を殺菌水で200 mlにした試料溶液を基準試料とした。照射基準試料液の定容をnutrient agar平板培地にガラスステッキで拡げ、30℃で3日培養後生ずるコロニーの計数により廃糖蜜のミクロフローラの線量に対する変動を調べた。

廃糖蜜のミクロフローラを構成する主要菌として*Bacillus subtilis*を数株、上記培地で分離・同定した。*B. subtilis*の単菌培養の必要が生じたので標準株として*B. subtilis* IAM 1069を使用した。標準株の耐放射線性の測定は次のように行なった。基準試料液に前培養5日の標準株菌体を懸濁させ、定線量を照射、照射後80℃で10 minの熱処理により栄養細胞を不活化し、子嚢胞子のみを残した。この懸濁液の定容をglutamate-glucose agar平板培地²⁾に接種、3日間30℃で培養後コロニーの計数を行なった。

3. 照射方法

試料の照射は原研高崎研の80,000 Ci 板状⁶⁰Co線源により線量率、 3.0×10^5 R/hr, 室温21℃で行なった。

4. 酵母の増殖度の測定・醗酵試験

malt extract-yeast extract agarで30℃、24 hr前培養した*Saccharomyces cerevisiae* 醗研1号株を用い、基準試料液に酵母懸濁液を加え増殖度試験試料とした。調製試料は30℃で65 hr培養し、数時間毎にサンプリング、コロニー計数を行なった。醗酵試験はA) 80℃、30 minの加熱法、B) 3.0×10^5 R、C) 6.0×10^5 Rの照射法、の3種の殺菌処理を行なった培地について行ない、各系統あたりTable 1に示すように4種の醗を調整した。醗酵は調整醗を30～32℃の恒温槽で静置培養法で行ない、1日に2回フラスコの攪拌を行なった。

Table 1. Composition of mashes

Mashes	Diluted molasses (31.82 wt%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ added	Yeast extract added	Yeast ^a
1	500 g			5 ml
2	500	0.476 g (0.100 g as N)		5
3	500	0.238 (0.050 g as N)	0.79 g (0.050 g as N)	5
4	500		1.58 (0.100 g as N)	5

^a Yeast suspension (*S. cerevisiae*, strain Hakken No. 1) was pre-incubated for 48 hrs. in sucrose solution of Bx. 12 in 3 liter meyerflask. Concentration of yeast is 5.8×10^7 cells/ml.

実験結果および考察

Nutrient agarで検索した結果、廃糖蜜のマイクロフローラは*Bacillus subtilis*が主要部分を占めることを見出し、数株の*B. subtilis*を分離・同定した。廃糖蜜をタンク貯蔵し、常温で放置すると発泡現象のみられることから、野性酵母の存在を想定し malt-extract broth, malt extract-yeast extract agar などの培地を使用し検索を繰り返したが、酵母菌は分離できなかった。廃糖蜜が高糖濃度であり、また酸素濃度のかなり低い状態で"沸き"現象のみられることから嫌気性発酵性菌の存在を想定、嫌気培養を行なったところ*Clostridium*属の存在をみとめた。

稀釈廃糖蜜液の照射線量に対する好気性菌の総菌数の変化を示したのがFig.1である。この測定条件(nutrient agarで検出)で得られた総菌数は 5.6×10^2 cells/g (廃糖蜜原液)であり、菌数が少ないため数値にばらつ

Fig. 1 Survival microorganisms in molasses mash vs. Dose.
o: Total survivors detected on nutrient agar.
●: Endospore of *B. subtilis* strain IAM 1069, detected on glutamate agar.

きが見られるが、 2.8×10^5 R の照射により生存菌数は無処理液の総菌数の約 10 % に減少する。標準株 *B. subtilis*, IAM 1069 の子嚢胞子の照射線量に対する生存率曲線は、総菌数のそれに一致し、線量に対し指数関数的に減少する。子嚢胞子の完全殺菌線量 ($= 12D_{10}$) は 3.3×10^6 R である。

Table 2. Comparison of survival microorganisms, mainly *Bacillus subtilis*, in molasses mash^a after irradiation and heating treatments

Treatment	Survivors	Survival
No treatment	140 cells/ml	100 %
80°C, 30 min	100	71
3.0×10^5 R	18	13
6.0×10^5 R	2~3	1~2

^a Mash contained 50 g of molasses and 0.2 g of ammonium sulfate per 200 ml.

廃糖蜜の γ 線による殺菌効果を加熱処理法と比べると、Table 2 にみられるように加熱処理では約 70 % の菌が生存するのにに対し、 3.0×10^5 R では約 10 %、 6×10^5 R では約 1 % に減少し、照射処理法の顕著な殺菌効果をもとめた。

γ 線処理を行なった廃糖蜜液の酒母醪としての適性をみるために、各種処理醪における *S. cerevisiae* 酸研 1 号株の増殖度を調べた。Fig. 2 から明らかなように、熱処理醪と照射処理醪において *S. cerevisiae* の培養時間に対する増殖度の挙動に差はみとめられなかった。さらに、殺菌処理を施さない醪においても処理醪と有意の差はみとめられなかったが、これは実験室という比較的きれいな測定条件のためであると考えられ、工業生産現場には当てはまらないとみるべきで

Fig. 2. Growth curves of *S. cerevisiae* in molasses mashes.

- : untreated
- : irradiated by 3.0×10^5 R.
- : irradiated by 6.0×10^5 R.
- ◻: kept at 80°C for 30 min.

あろう。培地の pH 値は培養開始時の 5.2~5.3 に対し、培養 52 hr 後 pH はいずれの処理区においても 4.7 であり、処理法の違いにより影響されていなかった。

Fig. 3 は酵母エキスを添加区と窒素源無添加区の CO₂ ガスの生成曲線を示したものであり、Fig. 4 は各仕込配合区における殺菌処理法の種類によるアルコール収率、Y の差異を図示したものである。アルコール収率(醱酵歩台)、Y は次式¹⁾、

$$Y(\%) = \frac{\text{熟成醪容量}(\ell) \times \text{熟成醪アルコール分}(\%)}{\text{蒸餾醪容量}(\ell) \times \text{蒸餾醪全糖分}(\text{vol}\%)} \times 100, \quad \text{分}(\text{vol}\%) \times 0.6439$$

の定義にしたがった。酵母エキスを添加した醪(A₄, B₄, C₄) および酵母エキスを添加した醪(A₃, B₃, C₃) では、熱処理区(A)および 3 × 10⁵ R と 6 × 10⁵ R の照射処理区(B と C) においてガス生成曲線およびアルコール醱酵収率、Y 値にほとんど差がみられない。しかし硫酸のみの添加区ではガス生成曲線において熱処理区(A₂)は、照射処理区(B₂, C₂)に比べて、ガス生成の開始時期が遅れる傾向がある (Fig. 3-b)。この場合 2 つの照射区、B₂ と C₂、では B₃ または B₄, C₃ または C₄ と比べてガス生成曲線および Y 値に大きな差はみとめられなかった。以上 3 種の窒素源添加区の醱酵生産性を Y 値で比較すると、A₂ < A₃ < A₄ ≐ C₂ ≐ C₃ ≐ C₄ < B₂ = B₃ = B₄ の関係が見出された。すなわち照射処理により醱酵歩台を増大させる効果がみとめられる。照射線量としてはこの場合、3.0 × 10⁵ R の方が 6.0 ×

Fig. 3-b. Irradiation effect on production of CO₂ gas in ethyl alcohol fermentation in molasses mash

○: kept at 80°C for 30 min.
●: irradiated by 3.0 × 10⁵ R
●: irradiated by 6.0 × 10⁵ R

In Fig. 3-b, molasses mashes used contained 0.095 g of ammonium sulfate per 100 g of mash.

Fig. 3-a. Irradiation effect on production of CO₂ gas in ethyl alcohol fermentation in molasses mash.

○: kept at 80°C for 30 min.
●: irradiated by 3.0 × 10⁵ R
●: irradiated by 6.0 × 10⁵ R

In Fig. 3-a, two kinds of molasses mashes were used; one contained 0.158 g of yeast extract per 100 g of mash (upper part of the figure) and the lower was with no nitrogen source addition.

10^5 R より良好な結果を示している。

この醗酵促進効果のより顕著な例は窒素源無添加の醗においてみとめられた。

Fig. 4 で明らかなように熱処理醗, A₁ ではY値が60%であるのに対し, 照射醗, B₁では74%, C₁では72%であり照射処理を醗に施すことにより醗酵歩合の増大を期待できることが明らかとなった。醗酵歩合の生産現場における定性的追跡は, 醗酵停止後の醗の残存直接還元糖濃度を比較することにより行なわれている。A₁の残直糖は2.7 wt.% であるのに対し, B₁のそれは1.6 wt.%, C₁のそれは1.8 wt% であり, 残直糖濃度からも照射処理区(この場合窒素源無添加)の醗酵歩合のよいことがわかる。

この放射線照射処理に伴う醗酵歩合増大効果の原因についてはまだ明らかになっていない。しかし, 後述のように糖分濃度が照射処理により変化しないことを考慮すると, たとえば廃糖蜜中に含まれる蛋白質あるいはアミノ酸等の有機態窒素が放射線により分解等の変化を受け, 酵母に利用され易い形態をとるようになったのではないかなども推論される。また, 全体として糖濃度に変化がなくとも, 糖成分の構成が放射線により変化しなかったとの証明にはならず, 廃糖蜜中の糖が放射線作用による分解などのため醗酵に有効な糖基質が増加したためであるとも考えられる。

醗酵終了後の総菌数および活性菌濃度(メチレンブルーに染まるもの)については, 窒素源無添加区を除き照射区および非照射区に大きな差異はみとめられなかった。

醗酵生産物のアルコールの醗からの蒸溜過程において, 加熱に伴う泡立ちが照射処理をしたものでは非照射のものより極端に低い現象がみられた。また, 醗酵進行中においても照射醗は非照射醗にくらべて攪拌時に泡立ちが低く半分位であった。このように照射醗で泡立ちが低下したことは, 照射処理により醗成分がなんらかの変化を受けていることを意味する。

廃糖蜜液の全糖濃度, 直接還元糖濃度とpHを照射線量に対しプロットしたのがFig. 5である。 1.0×10^5 Rから 9.0×10^5 Rの範囲では全糖濃度, 直糖濃度, pHともにほとんど未照射のものと変わらない。また, 照射処理をする場合に廃糖蜜原液を処理しても, 加水稀釈液を処理しても全糖濃度, 直糖濃度に差異のないことを確めた。廃糖蜜の稀釈液は322 mμに吸収極大を持つ巾の広い吸光度曲線を示す。この曲線の形は 1.0×10^5 Rから 6.0×10^5 Rの範囲で変わらず, また322 mμにおける吸光度も変わらない。

終りに, 本実験に御助力下さった天野久敬氏に感謝致します。

Fig. 4. Comparison of fermentation yield in molasses mashes.
A: kept at 80°C for 30 min.
B: irradiated by 3.0×10^5 R.
C: irradiated by 6.0×10^5 R.
Numbers in the figure correspond to those in TABLE 1.

Fig. 5. Dose-dependence of concentrations of total sugar (e) and of direct reducing sugar (o), and pH (•) in molasses.

文 献

- 1) HONDA, N. ed. 1963. *Alcohol handbook rev. ed.* Hakko kyokai, Tokyo
- 2) IIZUKA, H. and KOMAGATA, K. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**, 223-231 (1964)