the mixture is boiled for 30 min., then cooled, and the soap formed by the saponification is decomposed with 17 ml. of 25% HCl, and the free fatty acids are then extracted with 50 ml. of petroleum naphtha, and 25 ml. of this naphtha solution are titrated with a standard NaOH solution. When T is the volume of N/10 NaOH used for the titration, the fat content (%) can be calculated by the following formula :

$$F(\%) = \frac{T \times 284 \times 2 \times 1.04 \times 100}{W \times 10,000} = 5.907 \frac{T}{W}$$

For the determination in samples with high a starch content, KOH used for the saponification must be dissolved in EtOH.

連続醗酵に関する研究 (第3報)

実験室的規模に依る糖蜜の連続醗酵に就て

上田清基, 小嶋哲也, 宮坂隆之助, 朝井勇宣 (東京大学農芸化学科)

昭和 28 年 9 月 1 日 受理

Studies on the Continuous Fermentation. Part 3. Continuous Alcoholic Fermentation of Molasses by Laboratory Scale Equipment.

By Kiyomoto UEDA, Tetuya KOJIMA, Takanosuke MIYASAKA and Toshinobu ASAI
(Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

緒 言 先に第 1⁽¹⁾, 第 2 報⁽²⁾に於て糖蜜の醗酵に適する酵母を選択し, 更に醗酵の条件として特に栄養源量, 種菌の調製法其の他が酵母の増殖や醗酵に及ぼす影響を検討した. これによつて常に一定の醗酵及び増殖曲線を求めるために必要な条件を求めた. 本法のような流系攪拌方式による連続醗酵操作に必要な両曲線の相互関係を理論的に考察し, 主として第 1 槽について連続操作を行い, 定常状態を理論通り維持出来る事を証明した. 本報に於ては以上の基礎的な実験結果から糖蜜の連続醗酵を実験室的規模に於て実施した結果を報告する.

実 験

1. (A) 醗酵槽 第 1 槽及び第 2 槽は, その容量の割合をどう決めるかは, 醗酵の達成率, 装置間の均衡等から決定されるものである. 本実験では一応就れも同容積とし, 醗量は等量となるようにした. 醗酵槽は従来行われたこの種の実験より更に実際的な装置で行うため, 内容 10 l の glass jar fermentor を使用した. 両槽は同一の型式で醗は 6~7 l 入れた. これを簡単に示せば Fig. 1 の如くである. 醗酵は際しては, 生ずる CO₂

Fig. 1. Ten-Liter Fermentor Assembly.

Fig. 2. Flow Sheet of Continuous Fermentation

は trap に導き必要な開口以外はコックで閉じ, 外気と遮断した. 第 1 槽内には醗の液表面に達する溢流管を設

Photo. 1. Laboratory equipment of continuous fermentation.

Photo. 2. Continuous operation of primary fermenter.

け、第 2 槽の注入管と連結した。醗は第 2 槽の液面下に注入し、第 2 槽よりの液の排出は U 字管を使用した。即ち管の一端を槽の底部に、他の一端は槽外に導き醗の液面に位置させて溢流せしめた。本方式では醗は溢流によつて流れるのであるから両槽の醗量が等量の場合には従つて各槽についての cycle time は同一である。糖蜜醗は比較的腐敗し難く、又本法では醗の槽内滞留時間が短い事等の点から無役菌で行つた。かかる状態でも本実験を通じ別に支障は認められなかつた。

(B) 其の他の装置 醗酵槽及び其の他の装置は Fig. 2 の如くに設置した。操作法は次の如くに行つた。醗は貯槽 1 よりギヤポンプで上部の貯槽 2 に送り、これより貯槽 3 を通りオリフィスマーターで流量を調節しながら第 1 槽に連続的に醗を注入した。貯槽 3 の上部に溢流管を設け、槽内の液を絶えず一定水準に保つようにした。溢流した液は貯槽 1 に還流させた。糖蜜のような scale の多い醗では少量の液量の計量にオリフィスマーターやロタメーターでは操作がなかなか困難であり、後の実験では metering pump を使用した。

2. 糖蜜の二槽による連続醗酵 本実験では第 1 槽に接種する酵母は実験的見地から小さい inoculum size で行つた。即ち先ず inoculum size が $10\%/ml$ の場合の醗酵及び増殖曲線は前報で示したが、それより算出した cycle time を第 1 槽の醗酵の初期から後期の phase を追つて数段階に互に適用して相当する醗を feed した場合の第 1 槽の平衡状態は Table 1 の如くである。最初の 16 時間は普通に攪拌して醗酵させ、次に算出した cycle time で液を注入した。糖濃度及び酵母数は予め算出した cycle time の場合に於ける値と大差が無かつた。Growth curve は酵母の測定値のバラツキを考えれば吾々が便宜上画いた曲線よりも両側に拡がった帯状の曲線を考えねばならない。従つて正確な cycle-time は上記の曲線からは求められず、近似的な値となる。実際上では多少のズレは操作上の加減で調節が容易であるから、本実験では問題は無いものと考えた。

両槽についての結果 (但し cycle time 15 時間) は Table 2 の如くで、cycle time 14 時間に短縮した場合には第 2 槽より出る醗は残糖が多くなる。即ちこの場合では両槽について 30 時間の cycle time で醗酵がほぼ完了することを示す。

(3) 醗の pH を調節した場合の連続醗酵 全糖約 12% の醗が 2 槽を通過する間に醗酵が終了するには約 30 時間を要した。攪拌を行つた Batch fermentation の場合には約 30~32 時間を要した。既に中村等⁽³⁾は多

Table 1. Equilibrium of Total Sugar, Yeast Count and pH in the Primary Fermentor at Each Cycle Time calculated from Growth Curve Analysis in the Batch Fermentation.

Hours	Total sugar (as glucose) g/100 ml	Yeast Count Million Cells/ml.	pH	Cycle time (Hours)
0	12.40	1.	4.96	—
6	12.21	9.	—	—
9	11.99	20	4.96	—
12	10.74	55	4.78	—
15	8.53	96	4.80	—
17	7.06	85	4.80	8
18	7.20	88	4.92	//
19	7.35	—	4.90	//
20	7.35	83	4.95	//
21	7.20	93	4.87	//
23	6.17	112	4.83	10
24	6.32	—	4.83	//
25	6.03	112	4.92	//
26	6.03	—	4.97	//
27	5.88	101	4.92	//
28	5.43	—	4.90	//
29	5.43	107	4.92	//
30	5.43	103	4.97	//
31	4.70	108	4.89	15
33	4.49	115	4.86	//
34	4.27	110	5.01	//
35	4.41	100	4.89	//
37	4.11	100	4.97	//
39	3.97	118	4.83	//
41	3.82	107	4.93	//
45	3.24	118	4.85	//
47	3.31	104	4.80	//
51	3.46	114	4.80	//
55	3.24	104	4.87	//
59	3.31	111	4.90	//
63	3.34	112	4.89	//
67	3.53	107	4.88	//
69	3.24	106	4.87	//

Table 2. Continuous Fermentation of Molasses in High pH.

Hours	Primary Fermentor			Secondary Fermentor			Cycle Time (Hours)
	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH	
0	3.36	114	4.80	1.32	106	4.78	15
4	3.24	104	4.87	1.35	104	4.77	//
8	3.31	111	4.90	1.17	120	4.79	//
12	3.34	112	4.89	1.17	118	4.77	//
16	3.53	107	4.88	1.32	107	4.78	//
18	3.24	106	4.87	1.32	102	4.79	//
20	2.79	132	4.78	—	—	—	14
21	3.08	132	4.89	1.47	120	4.72	//
24	2.94	103	4.92	1.47	139	4.90	//
26	3.43	102	4.80	1.47	120	4.80	//
Mash : Total Sugar			12.40%	Inoculum Size 1 × 10 ⁶ /ml.			
pH			4.96				

筒式連続醱酵に於て糖蜜醱の pH を最適条件に調節する事により良い結果を得た。本法では醱酵は 2 槽に過ぎないので、増殖と醱酵に槽をはつきり区別し得ない。先ず第 1 槽の pH を約 4.0, 第 2 槽を約 3.2 に硫酸を添加して調節し連続醱酵を行つた結果は Table 3 に示す如くである。pH が余りにも低かつた為増殖酵母数の水準も低く、又後半には酵母の増殖が次第に阻害され、特に第 2 槽は死滅酵母が増大した。従つて糖の消費も低下し cycle time の維持が出来なくなつた。それで第 2 槽の pH を約 3.7 に調節した場合には、次第に糖消費も回復した。

以上の 2 回の連続醱酵の結果から次のような pH を保つて好結果得た。即ち醱の最初の pH を約 4.3 に調整し、連続操作が始つた時第 1 槽及び第 2 槽の pH が

Table 3. Continuous Fermentation of Molasses in Low pH.

Hours	Primary Fermentor			Secondary Fermentor			Cycle time (Hours)
	Total sugar g/100 ml.	Yeast count 10 ⁶ /ml.	pH	Total sugar g/100 ml.	Yeast count 10 ⁶ /ml.	pH	
0	12.50	1	4.10				
24	6.03						
28	2.35						15
30	2.35						//
44	3.23	109		1.23			//
46	2.79	99	3.86	1.23	112	3.72	Acid added
48	2.79	106	3.83	1.23	106	3.19	//
50	2.65	104	3.79	1.29	109	3.18	//
52	2.65		3.87	1.33		3.11	//
54	2.65	106	3.89	1.58	109	3.32	//
58	3.38	99	3.91	1.99	106	3.13	//
60	3.68		3.91	2.18		3.18	Feed Stopped
62	1.76	112	3.87	1.18	106	3.39	12
72	2.93		3.98	1.46		3.63	Alkali added
74	2.93		4.14	1.34		3.84	//
76	2.78		3.91	1.34		3.73	//
78	2.78	106	3.91	1.22	106	3.67	//
81	2.78	120	3.91	1.22	102	3.63	//

それぞれ約 4.0 及び 3.9 に平衡を保つようにした。その実験結果は Table 4 に示す如くで、連続 4 日間に互つて行つた。これにより明かなことは 2 槽式連続醱酵が極めて容易で且つ 2 槽について 24 時間 cycle で醱を流動させる事が可能である。若し酵母数の水準を高くして醱酵を行えば更に醱酵時間が短縮が可能である。操作法は

Table 4. Continuous Fermentation of Molasses in Optimum pH.

Hours	Primary Fermentor			Secondary Fermentor			Alcohol % by Weight	Rate of Sugar Fermented %	Rate of Alcohol Produced %
	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH			
0	1.71	126	4.10	1.17	126	4.03	5.46	90.6	85.5
12	1.92	133	4.06	1.19	131	4.01	5.52	90.6	86.4
24	2.48	109	4.01	1.22	128	4.01	5.52	90.2	86.4
36	2.55	112	3.98	1.21	121	4.03	5.41	90.3	84.7
48	2.25	113	4.08	1.18	118	4.02	5.41	90.6	84.7
60	2.35	122	4.13	1.20	110	4.01	5.52	90.4	86.4
72	2.68	127	4.08	1.19	128	4.05	5.52	90.5	86.4
84	2.62	111	4.05	1.22	123	4.01	5.41	90.2	84.7
96	2.55	125	4.03	1.17	111	4.03	5.52	90.6	86.4
Feed adjusted to 10 Hrs. Cycle									
106	4.12	127	4.12	1.29	125	4.17	5.20	89.7	81.2
Mash : Total Sugar 12.50 Inoculum Size 1×10 ⁶ /ml. pH 4.35									

Table 5. Continuous Fermentation of Molasses Started in Large Inoculum.

Cycle Time : 8 Hours.

Hours	Primary Fermentor			Secondary Fermentor		
	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH	Total Sugar g/100 ml.	Yeast Count 10 ⁶ /ml.	pH
0	1.86	180	4.13	1.08	192	3.98
2	1.40	182	4.14	1.22	205	4.01
4	1.84	192	4.14	1.03	192	4.08
6	1.89	187	4.13	1.05	192	4.07
8	1.87	182	4.14	1.02	192	4.07
Mash : Total Sugar 12.50 Inoculum Size 40×10 ⁶ Cells/ml. pH 4.40						

Table 6. Determination of Unfermentable Sugar in Molasses Used for Continuous Fermentation.

Hours	Total Sugar g/100 ml.			
	1	2	3	4
0	11.39	12.12	5.49	6.02
40	1.09	1.14	0.55	0.59
Sugar Fermented g/100ml.	10.30	10.98	4.94	5.43
Rate of Sugar Fermented %	90.43	90.59	89.99	90.20
Unfermentable Sugar %	9.59	9.41	10.01	9.80
Average				
Inoculum Size				
1, 3 : 200×10 ⁶ Cells/ml.				
2, 4 : 5×10 ⁶ Cells/ml.				

前報で示したように行つたもので inoculum size 40×10⁶/ml の場合ではその結果は Table 5 に示す如くである。全醱酵の cycle time は 16 時間に短縮された。

4. 非醱酵性糖の定量 本実験で使用した糖蜜が上記の system で醱酵した場合に充分醱酵されているか否かを一応次のように検討した。即ち約全糖 12% 及び 6% の醱に酵母を 200×10⁶/ml になるように投入し、30°, 40 時間醱酵を行い、残還元性物質を非醱酵性糖とした。その結果は Table 6 の如くである。全還元性物質中平均 9.69% が非醱酵性糖である。従つて上記の Table 4 の結果は極めて良好である。糖の定量は SOMOGYI 氏変法であつた。

考 察 及 び 要 約

醱酵に於て攪拌槽を直結し、一方から連続的に feed して行く方法は化学工業に於ける種々の連続流系攪拌反応法と同一式である。反応槽の数及びその容積の決定は反応の達成率に大きい関係を持つている。一般に連続流系攪拌反応系では、槽数の少い程近路現象のため反応達成率が悪く、従つて装置の単位容積当りの処理能力が減少する。糖蜜の醱酵の場合に於ても、batch fermentation と continuous fermentation とを上述の実験結果から比較すれば明かにこの現象が第 2 槽で著しい事が見られる。即ち全糖約 12% の醱の醱酵では、第 1 槽に於ては約 2/3 に相当する糖の消費に前者は約 18 時間で後者は約 12 時間で達する。しかし第 2 槽では前者は約 6～8 時間を要して醱酵が完了する、後者は約 12 時間位の滞留時間を要する。従つて全醱酵時間は両者とも 1 cycle については同一である。後者の場合では第 1 槽で時間の短縮が出来るが、第 2 槽では、完全な糖の消費が達成されねばならない事に制約を受け、近路現象を補うため滞留時間が長くなる。この現象を防ぐには槽数の増加によつて或程度可能であるが、実際的な問題としては実施が困難であり、又最初の目的とも反する。従つて装置上の検討は目下研究中である。又醱酵率を高めるため酵母数を抑制する事の問題も検討中である。

以上要約すれば、実験室的規模の 2 槽式連続醱酵装置を設置し、糖蜜の連続醱酵を行つた。醱の pH を 4.0 附近に両槽を調節する事により全醱酵時間 (1 cycle) を 24 時間で実施する事が出来た。糖の消費及びアルコー

ル収量も良好で、且長時間に亘り酵母の衰退も無く実施する事が出来た。

本研究の結果は昭和 27 年 4 月の農芸化学会大会で報告した。

- (1) 朝井, 上田, 小嶋 : 農化, 26, 564 (1952). (3) 中村, 本多 : 醸学誌, 15, 31 (1937).
 (2) 同上 : 農化, 27, 586 (1953).

Summary

Molasses was successfully and continuously fermented in the laboratory plant with the cycle time of 24 hours and controlled pH for extended period without any apparent yeast degradation.

The fermentors consisted of two ten-liter glass jar fermentor in series. The mash was agitated mechanically and removed continuously by overflow system. When the yeast level, about 120×10^6 cells per ml., was maintained in the secondary fermentor, the fermentation cycle (24 hours) was nearly equal to that of batch fermentation which was inoculated with a small quantity of yeast and agitated mechanically. At the yeast level, about 190×10^6 cells per ml., the fermentation cycle was reduced to 16 hours.

麹菌蛋白分解酵素に関する研究 (第1報)

麹菌蛋白分解酵素の特性及び強力蛋白分解菌の検索に就て (その 1)

吉 田 文 彦 (野田産業科学研究所)

昭和 28 年 9 月 2 日 受 理

Studies on the Proteolytic Enzyme of *Aspergilli*. Part 1. Specificity of Proteolytic Enzyme of *Aspergilli* and Survey of Strains Producing Superior Proteinase Yields. (I)

By Fumihiko. YOSHIDA (Noda Industrial and Scientific Research Laboratory)

緒 言 Protease とは一般に peptide bond を加水分解する酵素の一群であり、古く WILLSTÄTTER 一派に依り proteinase と peptidase に分類されていた。然し 1937 年 BERGMANN, FRUTON⁽¹⁾ 等に依つて最もよく知られた proteinase が合成された peptide やその誘導体を分解することが分つて以来、もつと明確な区別は exopeptidase と endopeptidase に分けられた。

即ち exopeptidase は α -amino 又は α -carboxyl group (又は両方) のような free terminal polar group をいずれか一つ又は両方共有するような簡単な化合物にのみ作用し、明らかに天然の蛋白質には作用しない。そして多くの場合これらの酵素は “metal protein” として Mg^{++} , Co^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} 等の金属イオンで活性化される。これに対して endopeptidase は free の末端に amino 基又は carboxyl 基を有していない化合物又は sensitive な peptide bond に関係した α 以外の polar group を有する化合物に作用し、更に蛋白の中央の peptide bond にも作用し得る。

従つて麹菌の protease の特性及びその生産については黒野、滝沢⁽²⁾⁽³⁾、本多⁽⁴⁾、橋本⁽⁵⁾、半沢⁽⁶⁾、福西⁽⁷⁾、加藤⁽⁸⁾、川野⁽⁹⁾、AYRES, TOBIE⁽¹⁰⁾、J. JOHNSON⁽¹¹⁾、塩田⁽¹²⁾、DWORSCHACK⁽¹³⁾、DION⁽¹⁴⁾ 等の諸氏の報告がある。著者は広く *Aspergillus* 属の糸状菌より蛋白分解力の強力なる菌株を検索中、之等の protease に 2 種類の type があることを知つた。即ち中性附近 (pH 6~8) に opt. pH を有し、pH 2, 35°, 1 hr. の処理で非抵抗性、pH 9, 35°, 1 hr. の処理で抵抗性の 1 群と酸性 (pH 2~4) に opt. pH を有し、前者と全く逆の性質を有する 1 群である。このような事柄は糸状菌 amylase に於いて岡崎⁽¹⁵⁾ が報告された所であるが、今回 protease についてその概略及び検索を行つて得た知見につき報告する。

実 験 方 法

[I] 供試菌株 東大坂口研究室、食糧研究所及び当研究所保管の *Aspergillus* 属糸状菌 542 株。

[II] 酵素液調製 麹 5g に 80% 撒水し、10 lb, 30 min. 殺菌し各菌株を接種し、30°, 3 日間培養し、その 5g を蒸留水 25 cc と共に磨碎し toluol 添加の下に常温で 15~20 hrs 放置しこれを濾過して透明な濾液を酵素液とする。

[III] 基質の調製