

バイオエタノール生産における酵母の発酵に必要な 栄養素供給能を有する食品類の探索*

重 松 幹 二**

戸 高 昌 俊**

Screening of foods contributing nutrients supplying for yeast fermentation in bioethanol production

Mikiji SHIGEMATSU and Masatoshi TODAKA

ABSTRACT

By a simple experimental method using dry yeast and PET bottles, the effect of various foods on ethanol fermentation in a nutrient-lack condition was investigated. It was shown that the addition of miso powder had the large effect. However, the excessive dose resulted down of fermentation by the increase in salt concentration, then it was necessary to adjust an appropriate dosage. In the other foods, house cricket (*Acheta domestica*) powder and dried bunashimeji (*Hypsizygus marmoreus*) mushroom had significant promotion effect on fermentation rate. Further, dried bunashimeji mushroom and coriander spice were effective to increase the fermentation yield. Dried bunashimeji mushroom was highly effective in both fermentation rate and fermentation yield. Also many of tea leaves accelerated the fermentation rate. For example, undrunk moringa and black tea leaves showed effective in supplying nutrients for fermentation. However, the ability of supply nutrients significantly decreased in the used tea leaves. It is hoped that the simple experimental method used in this study will contribute an assistance on activities in high school club research.

Key Words : Bioethanol, Fermentation Rate and Yield, Dry Yeast, Promotion and Inhibition, Miso, Bunashimeji (*Hypsizygus marmoreus*), Unused and Used Teas, High School Club Research

1. はじめに

再生可能エネルギーのひとつであるエタノールは炭素数2のアルコール (C_2H_5OH) でガソリンに混合して自動車燃料に用いることができ、カーボンニュートラルとして扱われる。燃料用のバイオエタノールを安く大量に製造するためには、安価な未利用資源を原料として、速く、高濃度に製造できることが望ましい。原料として日本で豊富な森林資源に求めると、食料との競合を避けることができ有利である。しかし、セルロースのグルコースへの糖化处理において、フェノール類やアルデヒド類などの発酵阻害物質が副生するため、その解決が課題となる。

前報^[1]において、ドライイーストとペットボトルを用い、高校の部活動研究に適した簡易なエタノール発酵

の実験方法を紹介した。さらにそこでは、発酵を促進する物質の探索例も紹介した。発酵を促進する添加物が見つければ、発酵阻害物質が混在していても克服することが期待できる。発酵を促進する添加物には、疎水性の各種固体^[2]、生薬や漢方薬の抽出残渣^[3,4]などが報告されている。さらには広範囲な探索も行われ、乾燥キノコ類、茶葉類、スパイス類などにも有望な物質が見つまっている^[5]。一方、酵母の増殖にはタンパク質等の栄養素が必要であり、その供給源として、ホエイプロテインや豆乳、きな粉やカレー粉など各種食品類の効果を検討したが、前報^[1]では良好な結果を得ることはできなかった。

そこで本報では、栄養素供給能を有する物質の探索を目的とし、各種食品類の効果を検討した結果を報告する。

2. 実験方法

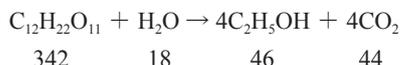
高校生向けに執筆した前報^[1]の方法を採用し、エタノール発酵挙動を追跡した。すなわち、キャップを半

* 令和4年11月30日受付

** 化学システム工学科

開きにした耐熱性ペットボトル中で、基質であるグラニュー糖 150g/kg あるいは 250g/kg を標準とし、パン製造用酵母であるドライイースト（日清フーズ製スーパーカメリヤ）1.0g/kg を添加して 25°C で発酵を行った。およそ 3 時間おきにボトル全体の重量を測定し、その重量減少量を発酵によって発生する二酸化炭素排出量とみなした。なお、本報は主に酵母の増殖に必要な食品類の栄養素供給能を調べるのが目的であるため、各種食品類を 30～90g/kg 添加して発酵を行った。なお、研究用培地の栄養素として汎用される酵母エキス（オリエンタル酵母製 BSP-B845）と微生物培養基材用のペプトン（日本新薬製ハイポリペプトン S）を標準物質として比較対象とした。いずれも水に易溶であり、固形不溶分は生じない。

発酵によるエタノール生成の反応式は、二糖類（スクロースやマルトース）を原料とする場合、下記のように表される。ここで下段の数値は各物質の分子量を示す。これらの分子量から、100g の二糖類からは 53.8g (=46 × 4 / 342) のエタノールと 51.5g (=44 × 4 / 342) の二酸化炭素が生成する計算になる。



3. 結果と考察

3.1 栄養素欠乏状態でのエタノール発酵挙動

図 1 (a) および (b) は、栄養素として標準物質である酵母エキスとペプトンの投与量を変え、25°C におい

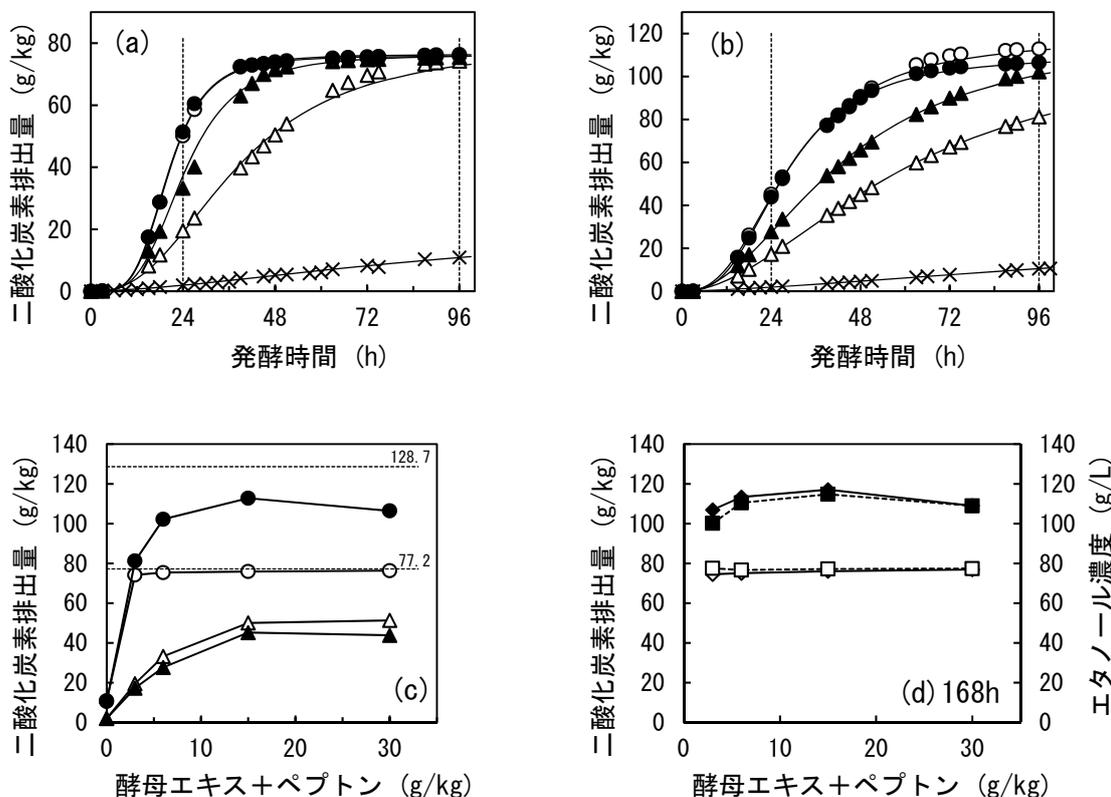


図 1：栄養素欠乏状態でのエタノール発酵挙動

- (a) 初期糖濃度 150g/kg、(b) 初期糖濃度 250g/kg のときの二酸化炭素排出挙動
 - × 酵母エキス、ペプトンともに無添加 (Y00+P00)
 - △ 酵母エキス 1g/kg + ペプトン 2g/kg (Y01+P02)
 - ▲ 酵母エキス 2g/kg + ペプトン 4g/kg (Y02+P04)
 - 酵母エキス 5g/kg + ペプトン 10g/kg (Y05+P10)
 - 酵母エキス 10g/kg + ペプトン 20g/kg (Y10+P20)
- (c) 発酵速度の指標 (24 時間後の二酸化炭素排出量) と発酵量の指標 (96 時間後の二酸化炭素排出量)
 - △ 初期糖濃度 150g/kg の発酵速度、▲ 初期糖濃度 250g/kg の発酵速度
 - 初期糖濃度 150g/kg の発酵量、● 初期糖濃度 250g/kg の発酵量
 破線は、最大二酸化炭素排出量の理論値 (初期糖濃度 × 44 × 4 / 342) を示す。
- (d) 1 週間後の二酸化炭素排出量とエタノール濃度実測値
 - ◇ 初期糖濃度 150g/kg の二酸化炭素排出量、□ 初期糖濃度 150g/kg のエタノール濃度
 - ◆ 初期糖濃度 250g/kg の二酸化炭素排出量、■ 初期糖濃度 250g/kg のエタノール濃度

てドライイースト 1.0g/kg でエタノール発酵を行った時の二酸化炭素排出量の経時変化を示す。初期糖濃度 150g/kg、250g/kg いずれにおいても、酵母エキス 5g/kg + ペプトン 10g/kg (Y05+P10) を与えることで発酵は順調に進行し、Y10+P20 と倍に増やしてもはやそれ以上の向上は見られなかった。すなわち、Y05+P10 で栄養素は充分に供給できていることになる。一方、Y02+P04 あるいは Y01+P02 のように栄養素を減らすと発酵は順次低下し、Y00+P00 に至っては投与したドライイースト 1.0g/kg に含まれる栄養素のみでの発酵になるため、極めて緩慢であった。なお、初期糖濃度 250g/kg では、発酵後期で Y10+Y20 の方が Y05+Y10 よりもやや発酵が低下した。これは、高い糖濃度に過度の栄養素が加わって浸透圧が高くなりすぎ、酵母の成長が阻害したことが原因と考えられる。

以上の結果より、以後の実験は過剰投与条件である Y10+P20 を標準条件とし、これとの比較で議論することとした。また、24 時間後と 96 時間後の二酸化炭素排出量をそれぞれ、発酵速度と発酵量の指標とすることとした。図 1 (c) は、両指標を栄養素濃度に対してプロットしたものである。糖濃度 150g/kg から 250g/kg に上げることで、発酵速度の指標である 24 時間後の二酸化炭素発生速度はやや低下した。これは糖濃度の増加に伴う浸透圧の上昇により、酵母の成長が阻害したことが原因と考えられる。また、発酵量の指標である 96 時間後の二酸化炭素排出量では、初期糖濃度 150g/kg から発生しうる二酸化炭素量 77.2g/kg に到達しているが、250g/kg では発生しうる二酸化炭素量 128.7g/kg には到

達しておらず、基質である糖は代謝されずに残存していることとなる。

図 1 (d) は、1 週間 (168h) 後における二酸化炭素排出量と、ガスクロマトグラフィーで測定したエタノール濃度の実測値を示す。ここで、両者の挙動は良く一致しているため、重量計測という簡便な測定でもエタノール発酵の追跡が可能であると言えよう。初期糖濃度 150g/kg においては、栄養素濃度に関わらず 1 週間後にはエタノール濃度は 75g/L に達していた。図 1 (c) で示したように栄養素欠乏状態では発酵速度は遅いものの、96 時間後には二酸化炭素排出量は限界値に達しており、発酵は完了していたといえる。一方、初期糖濃度 250g/kg の場合は、1 週間後のエタノール濃度は最高でも 117g/L に留まっていた。図 1 (c) の結果と同様に、基質である糖が残存したまま発酵が停止したといえる。なお、栄養素が欠乏していても 1 週間待てば緩慢ではあるが発酵は続いていたことは、死滅した酵母を栄養素源として酵母の世代交代が継続していたためと考えられる。

以上より、速くエタノールを得るためには増殖に必要な栄養素を充分供給すること、糖濃度を過度に増やしてもそれに比例して高濃度のエタノールが得られるわけではないことが示された。

3.2 エタノール発酵に対する食品類の栄養素供給能

次に、酵母エキスやペプトンの代用品を探すため、容易に入手できる食品類の栄養素供給能を調べた。本報で用いた食品類をその栄養成分表示値とともに表 1 に示

表 1：本報でエタノール発酵の栄養素供給源として調査した食品の栄養成分表示値

	エネルギー (kcal/100g)	タンパク質 (g/100g)	脂質 (g/100g)	炭水化物 (g/100g)	食塩相当量 (g/100g)
粉末白みそ (キャメル珈琲製)	350	12.5	11.5	39.5	21.5
粉末赤みそ (キャメル珈琲製)	353	24.8	12.5	35.8	21.3
ココロギ粉 (タイ産)	410	75.9	6.8	11.4	1.3
ビール酵母 (アサヒグループ食品製)	315	55.0	4.0	28 ~ 30.2	0.1 ~ 1.0
乾燥バナシメジ (香川県産)	記載なし				
小麦胚芽 (キャメル珈琲製)	432	30.8	11.6	51.1	0.0
かつお削りぶし (マルトモ製)	351	75.7	3.1	0.3	1.1
乾燥シイタケ (西鉄ストア製)	182	19.3	3.7	63.4	0.0
米ぬか (大分県産)	412	13.4	19.6	48.8	0.0
モリンガ葉粉末 (モリンガ製)	317	22.7	7.0	56.3	0.3
脱脂粉乳 (雪印メグミルク製)	357	36.3	0.6	51.5	1.1
コリアンダー (ヤスマ製)	記載なし				
大豆粉 (コダマ健康食品製)	475	45.7	23.4	20.5	0.0
白すりごま (神戸物産製)	599	20.3	54.2	18.5	0.0
そば粉 (五木食品製)	361	12.0	3.1	69.6	0.0

す。このうち、ブナシメジは生鮮品を常温で通風乾燥させ粉砕したものを準備した。ブナシメジは一般生鮮食品であるため、スパイスであるコリアンダーは人への栄養の供給源としての寄与の程度が小さく食品表示基準第3条第3項により栄養成分表示の表示義務がないため、記載がなかった。

これらの食品類を 30 ~ 90g/kg の 3段階で投与して発

酵させたときの、二酸化炭素発生量の経時変化を図2に示す。発酵速度を 24 時間後の二酸化炭素排出量と比較すると、粉末みその投与により比較的迅速に発酵が進んだ。ただし、90g/kg という大量投与では、みそに含まれる塩分の影響のためか発酵がやや低下した。また、発酵量を 96 時間後の二酸化炭素排出量と比較すると、これらの粉末みそでは酵母エキスやペプトンと遜色なく発酵

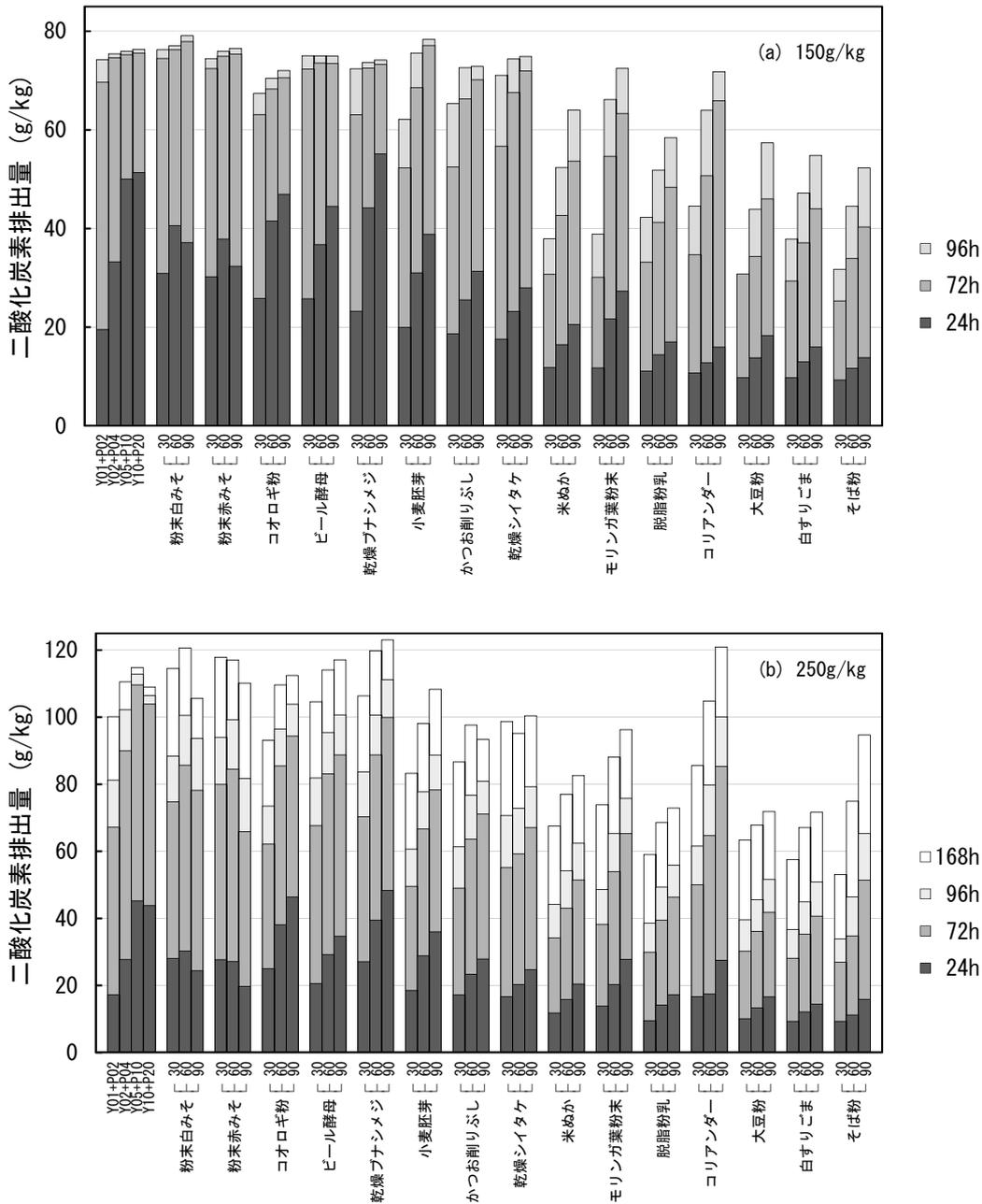


図2：各種食品類を栄養源としたときのエタノール発酵挙動

(a) 初期糖濃度 150g/kg、(b) 初期糖濃度 250g/kg

項目名の数値は添加量 (g/kg) を示す。図は、初期糖濃度 150g/kg に食品類 30g/kg を投与した時の 24h 後の二酸化炭素排出量を上位として並べている。

が完了した。すなわち、粉末みそへの代替は、発酵速度は若干遅いものの、3～4日待てば十分に発酵が完了したといえる。なお、過度の糖濃度である250g/kgでは、1週間(168h)後には酵母エキスやペプトンよりもむしろ多くの二酸化炭素が排出される効果が得られた。これについては次節で詳しく述べる。

そのほかの食品類では、発酵速度に対してはココロギ粉や乾燥ブナシメジの効果が高かった。また、発酵量に対しては乾燥ブナシメジやコリアンダーの効果が目立ち、特に4日～1週間(96～168h)にかけての伸びが大きく、添加量にも大きく依存した。これらは、アミノ酸やタンパク質の含有量、さらにはそれらの水可溶性の違いが影響しているものと推定される。なお、乾燥ブナシメジは発酵速度と発酵量の両方に高い効果を発揮しており、さらには栄養素が豊富な条件に対しても発酵促進

効果が見られることを報告しており^[5]、今後さらなる検討が望まれる。

3.3 粉末みその栄養素供給能

前述のように、基質である糖濃度を増すことでエタノール生成量はある程度増すものの、代謝物である高濃度のエタノールの蓄積によって発酵は阻害を受ける。また、過度の糖濃度では高浸透圧のため発酵が阻害する。さらに、粉末みそを栄養素として与えた場合、過度の投与は塩分の増加を伴うため発酵を阻害し、結局得られるエタノール濃度は上限を迎える。そこで、糖濃度と粉末みそ投与量の関係を調べることで、発酵が最大となる適正值を探ることとした。

図3は、粉末みその栄養素供給能について、糖濃度と投与量の影響を検討した結果である。発酵時間4日(96h)

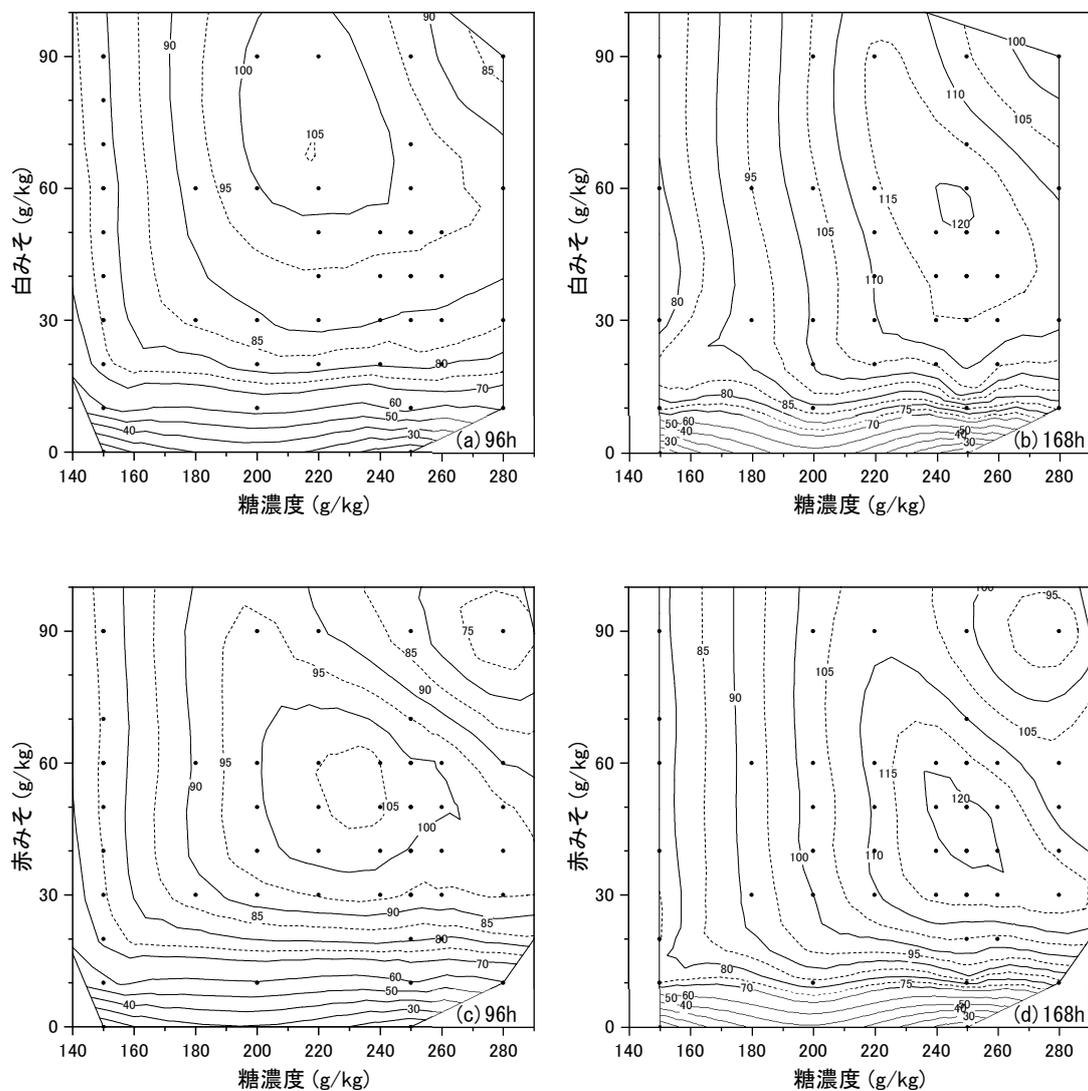


図3：初期糖濃度と粉末みそ投与量を変えたときの発酵後期での二酸化炭素排出量 (g/kg)
 (a) 白みそ4日(96h)後、(b) 白みそ1週間(168h)後、(c) 赤みそ4日(96h)後、(d) 赤みそ1週間(168h)後

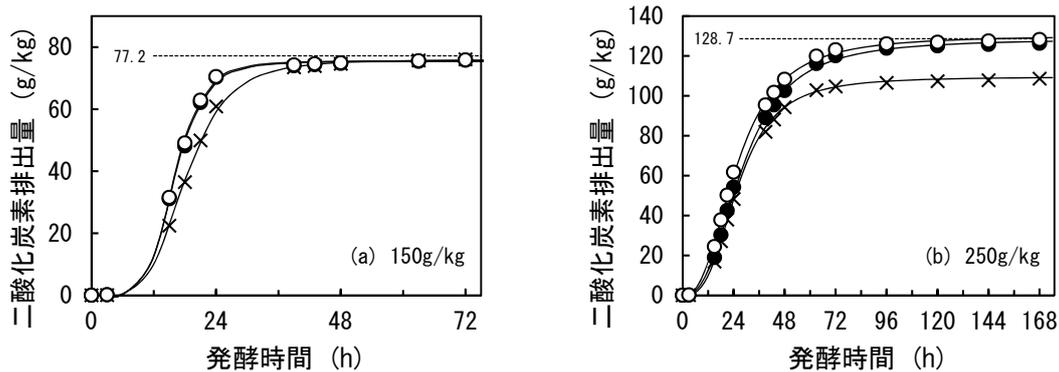


図4：粉末みその発酵促進効果

(a) 初期糖濃度 150g/kg + 酵母エキス 10g/kg + ペプトン 20g/kg
 (b) 初期糖濃度 250g/kg + 酵母エキス 10g/kg + ペプトン 20g/kg
 × みそ無添加、○ 粉末白みそ 10g/kg 添加、● 粉末赤みそ 10g/kg 添加
 破線は、最大二酸化炭素排出量の理論値（初期糖濃度×44×4/342）を示す。

で判断すると、図3 (a) の白みそでは糖濃度 220g/kg に白みそ 70g/kg を投与した時、図3 (c) の赤みそでは糖濃度 220 ~ 240g/kg に赤みそ 50 ~ 60g/kg を投与した時に二酸化炭素排出量は 105g/kg を越えた。この値はエタノール濃度が 100g/L 程度にまで到達したことに相当する。また、図3 (b) および (d) に示すように1週間 (168h) 発酵を続けると、糖濃度 250g/kg に白みそ 50 ~ 60g/kg もしくは赤みそ 40 ~ 50g/kg を投与することで、最大二酸化炭素排出量は 120g/kg を越えた。この値は図1 (c) に示した酵母エキスとペプトンを投与しても到達できなかった値である。また、最終エタノール濃度を分析したところ、Y10+P20 では最大 117g/L であったのに対し、粉末白みそで 130g/L、粉末赤みそで 128g/L と高濃度のエタノールを得ることができた。

図4は、粉末みその発酵促進効果を調べたものである。ここでは標準量の酵母エキス 10g/kg とペプトン 20g/kg を与えており、栄養素は十分に供給している。初期糖濃度 150g/kg に粉末みそを 10g/kg 添加すると、15 ~ 24 時間の二酸化炭素排出量は無添加より多く、発酵促進効果が観察された。また、初期糖濃度 250g/kg のときも粉末みそを添加することで発酵速度が向上し、さらに発酵を継続すると無添加よりも多くの二酸化炭素を発生し、1週間 (168h) 後には理論発生量の 128.7g/kg に到達した。前述のように初期糖濃度 250g/kg は過剰条件であるため、粉末みそ中の糖分が加味されて発酵が進んだとは考えにくい。粉末みその発酵促進効果によって、酵母にはストレスの大きな悪条件であっても発酵し続けたものと思われる。

以上のように、粉末みそは投与量を適切に設定することでエタノール発酵の栄養源として優秀に作用することがわかった。同時に、発酵促進効果も期待でき高濃度のエタノールを得ることがわかった。なお、通常のみそ

には生きたこうじ菌が含まれているため、異なる結果となる可能性もある。

3.4 茶葉類の発酵促進効果と栄養素供給能

上記の食品類のほかには、茶葉類の活用も期待される。特に茶葉は飲用後に多くの廃棄物が発生するため、その有効利用が望まれる。そこで、茶葉類およびその使用済み残渣の発酵促進効果と栄養素供給能を調べた。ここで発酵促進効果は、糖濃度 150g/kg で栄養素が豊富な状況 (Y10+P20：酵母エキス 10g/kg + ペプトン 20g/kg) に、茶葉類 10g/kg 添加した時の 15 時間後の二酸化炭素排出量 (g/kg) を比較することで評価した。また栄養素供給能は、糖濃度 150g/kg で栄養素欠乏状態 (Y00+P00：酵母エキス、ペプトンともに無添加) で、茶葉類 30g/kg 添加した時の 96 時間後の二酸化炭素排出量 (g/kg) を比較することで評価した。検討した茶葉類を表2に示す。いずれも市販のティーパックで、通常の飲用方法によって生じた残渣を水洗したものを使用済み茶葉とした。なお、茶やコーヒーは食品表示基準第3条第3項により表示義務がないため、これらの栄養成分表示は記載がなかった。

図5は、茶葉類の発酵促進効果と栄養素供給能の結果を示したものである。ここでは比較のために、栄養素無添加の Y00+P00、栄養素標準添加の Y10+P20、固形物である粉末セルロースや活性炭、さらには前述の粉末みその結果もプロットしている。図5 (a) 横軸に示すように、未使用の茶葉は茶葉無添加である Y10+P20 の約 2 倍の発酵速度を示し、いずれも発酵促進効果を示した。特にモリंगाやマテ茶の効果が高く、緑茶はやや低かった。この発酵促進効果の実験では栄養素を十分に供給して行っているため、モリंगाやマテ茶の効果は栄養素が追加されたためとは解釈できない。また、図5 (a) 縦

表 2 : 使用した茶葉類の販売元と銘柄

緑茶	伊藤園製 お〜いお茶 緑茶
紅茶	ユニリーバ・ジャパン製 リプトンイエローラベル
ほうじ茶	伊藤園製 お〜いお茶 ほうじ茶
麦茶	日東食品工業製
コーヒー	ワールドコーヒー製 レギュラーコーヒー
ルイボス	南アフリカ共和国産
モリンガ	インド産
マテ茶	ブラジル産
アーティチョーク	ベトナム産

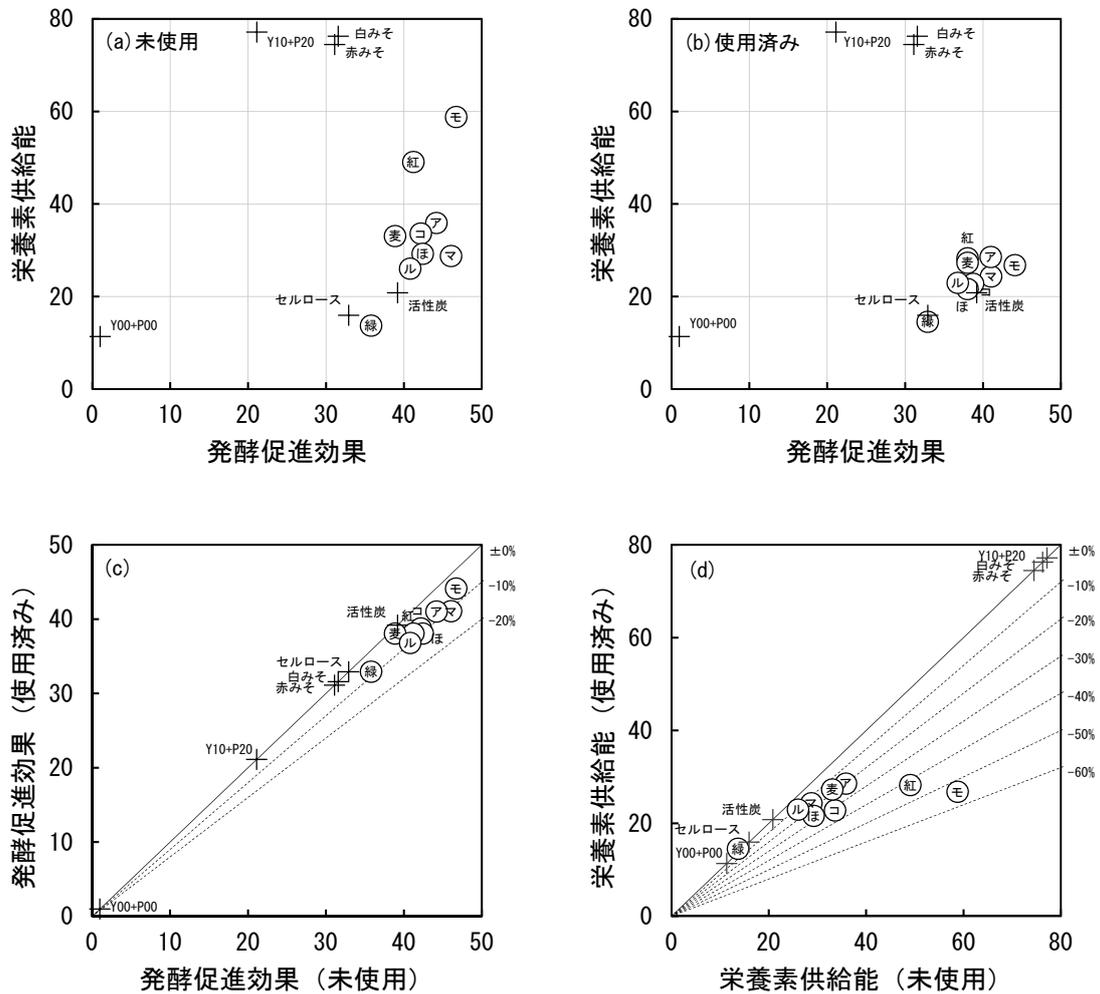


図 5 : 茶葉および使用済み茶葉残渣の発酵促進効果と栄養素供給能

(a) 未使用茶葉の発酵促進効果と栄養素供給能、(b) 使用済み茶葉の発酵促進効果と栄養素供給能、(c) 飲用使用による発酵促進効果の低下、(d) 飲用使用による栄養素供給能の低下

●緑茶、●紅茶、③ほうじ茶、④麦茶、⑤コーヒー、⑥ルイボス、⑦モリンガ、⑧マテ茶、⑨アーティチョーク

発酵促進効果は、初期糖濃度 150g/kg において栄養素が豊富な状況 (Y10+P20 : 酵母エキス 10g/kg + ペプトン 20g/kg) に茶葉類 10g/kg 添加した時の、15 時間後の二酸化炭素排出量 (g/kg) で評価した。

栄養素供給能は、初期糖濃度 150g/kg において栄養素欠乏状態 (Y00+P00 : 酵母エキス、ペプトンともに無添加) で茶葉類 30g/kg 添加した時の、96 時間後の二酸化炭素排出量 (g/kg) で評価した。

(c) および (d) の破線は、未使用茶葉に対する使用済み茶葉の効果の低下率を示す。

軸に示す栄養素供給能は、モリンガや紅茶が高い能力を示したが、緑茶はほとんど効果がなかった。緑茶はアミノ酸を多く含むものの、抗菌作用のあるカテキンによって相殺された可能性がある。総合するとモリンガは発酵促進効果と栄養素供給能の両者に効果的であった。一方、図5 (b) に示す飲用後の使用済み茶葉では、発酵促進効果はY10+P20の約2倍を維持していたが、栄養素供給能は大きく低下した。未使用と使用済み茶葉を比較するために再プロットした図5 (c) および (d) を見ると、発酵促進効果は10%程度の低下に留まるものの栄養素供給能は大きく低下し、モリンガに至っては半減した。これは、発酵促進効果は主に水不溶部の固形物効果という物理的作用が関与したため維持されていたが、栄養素供給能は飲用によってタンパク質等の水可溶分が溶出してしまったためと思われる。

以上のように、茶葉の栄養素供給能は、未使用ではエタノール発酵に有効なものが多いが、使用済み茶葉には期待できないという結果となった。なお、使用済み茶葉にはセルロース系炭水化物が残存しているため、加水分解によってグルコースを得ることで、エタノール発酵の基質としての有効利用が考えられる。

4. まとめ

栄養素欠乏状態でのエタノール発酵に対する各種食品類の効果について検討したところ、粉末みその添加効果が大きいことがわかった。ただし、過度の投与は塩分濃度の上昇をもたらす発酵が阻害するため、適切な投与量に調整する必要がある。ほかには、発酵速度に対してはコオロギ粉や乾燥ブナシメジが、最大発酵量に対しては乾燥ブナシメジやコリアンダーに目立った効果が見られた。乾燥ブナシメジは発酵速度と発酵量の両方に高い

効果を発揮するため、今後の詳細な検討が望まれる。茶葉類も発酵速度を促進するものが多く、栄養素供給能では飲用前のモリンガや紅茶が有効であった。しかし、栄養素供給能は使用済み茶葉では大きく低下した。

本研究の実験手法が高校部活動研究の一助となることを期待したい。

謝辞

本研究の一部は、(一財) 福岡県フィナンシャルグループ企業育成財団および科学研究費補助金 基盤研究(B) 22H03784の支援により行われた。

参考文献

- [1] 重松幹二：高校部活動研究のためのドライイーストとペットボトルを用いたバイオエタノール発酵速度実験：福岡大学工学集報 107&108, 1-11 (2022)
- [2] 竹崎道代、松浦一雄、広常正人、浜地正昭：酵母の増殖に与える固形剤の添加効果：日本醸造協会誌 88, 319-325 (1993)
- [3] 田中亜依、松山雅子、正本博士、コウハクルワサナ、重松幹二：生葉、漢方薬、およびそれらの抽出残渣のエタノール発酵促進効果：生薬学雑誌 74(2), 81-88 (2020)
- [4] 重松幹二、正本博士、松山雅子、田中亜依：発酵物の製造方法、エタノールの製造方法および乳酸発酵物の製造方法、ならびに発酵促進剤：特開 2020-65549
- [5] 重松幹二、池田和弘、牟田あかり、岡崎佑亮、コウハクルワサナ：バイオエタノール発酵を促進・阻害する固形物の探索：第72回日本木材学会大会 (2022)