

## 18. アルコール発酵

[目的] 発酵という現象は、微生物内の酵素による化学反応であることを学ぶ。またその最適温度を調べる。

[解説]

### 1. 微生物と酵素

古代より酵母による発酵によってお酒がつくられてきた(表1)。また味噌やしょうゆなどの調味料もコウジカビによる発酵を利用してつくられている。これは微生物のはたらきによるものであるが、この現象を科学的に理解するまでには、歴史的な変遷をへた。1789年、フランスのラボアジェはアルコール発酵とは、糖がエタノールと二酸化炭素に分解される反応であることを示した。1857年、フランスのパスツールは、アルコール発酵の際に不快な味をつける乳酸菌や酪酸菌を発見し、また1860年にアルコール発酵の際に酸素分圧が低いほど、酵母によるグルコース消費速度が速くなることを見いだした(パスツール効果)。1896年、ドイツのブフナーは、ビール酵母から抽出した無細胞液がアルコール発酵を起こすことを発見した。これにより、反応を起こすのは微生物中の酵素であることが明らかになった。1930年代に入って、酵素を純粋な結晶として取り出せるようになってから、一般的に酵素の本性はタンパク質であることが明らかになった。

表1. 醸造の過程

	原料
清酒	米 (でんぷん) ——— (糖化) ——— コウジカビ → グルコース ——— (アルコール発酵) ——— 酵母 → 清酒 (エタノール)
ワイン	ブドウ (グルコース) ——— (アルコール発酵) ——— 酵母 → ワイン

### 2. 酵素と生体反応

酵素はタンパク質であり、それは生体反応の触媒として働く。タンパク質はアミノ酸が連結してできている1本鎖の高分子であるが、アミノ酸残基同士が水素結合(N-H…Oなど)を形成することにより、 $\alpha$ -ラセン構造や $\beta$ -シート構造などが生じる。さらにそれが折りたたまれて特有の三次元構造を形成し、そのくぼんだポケットの中に特定の基質を取り込んで、反応を起こさせるが自分自身は変化しない。つまり、酵素は生体反応の触媒である。

一般に1つの酵素は、特定の1種類の基質あるいはそれに良く似た分子だけを取り込み変化させ、他の基質は取り込まない。これを基質特異性という。また、酵素反応の速度は温度によっても左右される。温度が低すぎると、通常の化学反応と同様に反応速度が低下するし、高温にするとタンパク質である酵素が熱で変性し、約70°C以上では活性が落ちてしまう。酵素反応において、反応速度が一番大きくなる温度を最適温度という。

### 3. 発酵と嫌気呼吸

酵母菌は空気中では通常の呼吸(好気呼吸)を行い、糖を二酸化炭素と水に分解する。グルコース

については次のような反応式となる．  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$  (1)

一方、酵母を酸素不足の状態にすると、嫌気呼吸によってグルコースがピルビン酸  $CH_3(CO)COOH$  をへてエタノールと二酸化炭素に分解される．  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$  (2)

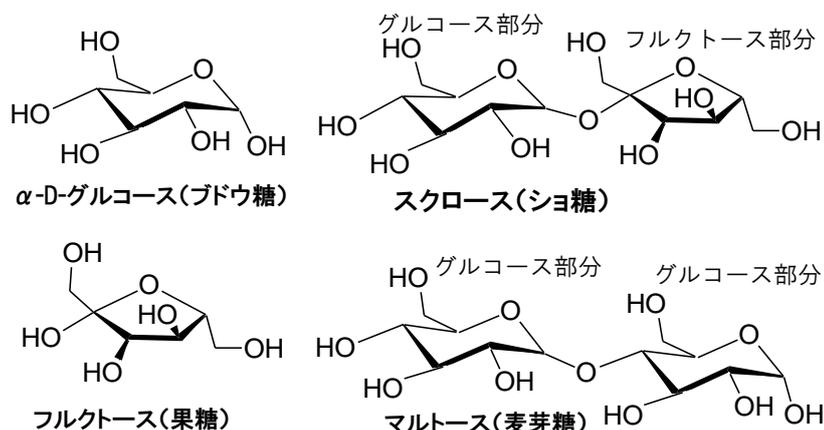
酵母によって発酵する糖は種類が限られている（表2）．酵母には実に15種類もの解糖系酵素が含まれており、グルコースをピルビン酸に変えるのに約10種類もの酵素が働く．ピルビン酸は酵素（カルボキシラーゼ）によって二酸化炭素を放出してアセトアルデヒド  $CH_3CHO$  となり、それが別の酵素（アルコールデヒドロゲナーゼ）によって還元され、エタノールとなる．スクロースは酵素（インベルターゼ）によって加水分解され、グルコースとフルクトース（いずれも分子式は  $C_6H_{12}O_6$ ）になる．



表2．酵母による発酵反応の基質依存性（活性は○，不活性は×）

単糖類	二糖類	多糖類
○ グルコース（ぶどう糖）	○ スクロース（ショ糖）	× アミロース*
○ フルクトース（果糖）	× マルトース（麦芽糖）	

(\*) アミロースはマルトースのようにグルコースが連続してつながったもので、でんぷんの1分子種である．



#### 4. 酵素反応の速度

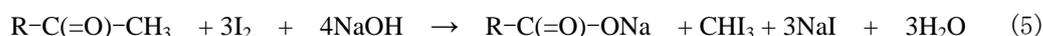
酵素Eと基質Sとが反応すると、錯合体ESが形成され、そして生成物Pができるが、酵素Eは変化しない．

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P \quad (4)$$

この反応速度は、基質の濃度 [S] が十分低いときには [S] に比例する．また、酵素が効率よく働くためには温度ならびに pH の制限も加わる．酵母によるアルコール発酵の最適温度は約 45℃であり、最適 pH は7付近である．なお、酵母をもちいた発酵の反応速度は、酵母の濃度が高いほど大きくなる．

#### 5. ヨードホルム反応

アセチル基  $-C(=O)-CH_3$  をもつ有機化合物に、塩基性条件下でヨウ素を作用させると、ヨードホルム  $CHI_3$  が生成する．ヨードホルムは特有の臭気を持ち、また生成量が多いときには淡黄色の結晶として反応液から析出するので検出しやすい．塩基性ヨウ素液は穏やかな酸化剤なので、酸化によってアセチル基を生じる化合物もヨードホルム反応をおこす．



## [実験]

### 1. スクロース(ショ糖)の発酵

①メスシリンダーを用いて約5%のスクロース水溶液を50 ml 測りとり、それを50 ml ビーカーに入れる。その液をガラス棒で攪拌しながら、乾燥酵母2.5 gを少しずつ入れて完全に溶かす。(これとは別に、糖度計を用いてスクロース溶液の糖度も測定しておく)。この酵母スクロース液をガラス棒でよく攪拌してから<sup>1)</sup>、シリコンチューブを通して50 mlのガラス製注射筒に吸い上げ、注射筒の先を上に向けて中の空気をぬき、液を正確に10 mlだけ筒内に残す。次に注射筒の先端にキャップをつけ、液がもれないようにする(この注射筒をAとする)。注射筒Aを逆さまに(キャップが底になるように)してスタンドに立て室温で静置し、発生する二酸化炭素の体積を5分毎、40分間測定する。<sup>2)</sup>

②ウォーターバススターラー(9ページ参照)の温度を確認して(実験台により40または50℃)、そのお湯を300 mlビーカーに汲み、湯浴の中に置く。上と同様にして、もう1本の50 ml注射筒にも酵母スクロース液を10 ml入れ、注射筒の先端にキャップをつける(この注射筒をBとする)。注射筒Bをキャップが下になるようにしてビーカー内のお湯に入れ、発生する二酸化炭素の体積を1分毎、20分間測定する。<sup>2)</sup>

③ウォーターバススターラーの温度を60℃にしてから、50 ml注射筒に酵母スクロース液を10 ml入れ、上と同様にして発生する気体の体積を1分毎、20分間測定する。(この注射筒をCとする)。

### 2. 二酸化炭素の確認

測定が終わった注射筒B中の気体を、シリコンチューブをつけた30 mlのプラスチック製注射筒に吸い込み、さらに石灰水  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  を少量吸い入れ振り混ぜる。これにより、炭酸カルシウムが生じ白濁する。この溶液を試験管に移し、沈殿の様子をさらに観察する。  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$

### 3. 糖度の測定とエタノールの検出

測定が終わり次第、それぞれの注射筒中の液体をろ過し、糖度計(14ページ参照)を用いて糖度を測定する。また、注射筒Bから得られたろ液2 mlを試験管にとり、それにヨウ素液<sup>3)</sup>を1 ml加える。振り混ぜながら、3M水酸化ナトリウムNaOH水溶液を、褐色がほぼ消えるまで滴下する。次にその液の臭いを調べる。また、純粋な試薬のヨードホルム  $\text{CHI}_3$  の臭いと比べてみる。

## [課題]

1. スクロース溶液を空気から遮断して酵母で発酵させると、エタノールと二酸化炭素に分解される。その化学反応式を書きなさい。
2. 酵母を用いて5%スクロース溶液10 mlを発酵させたところ、二酸化炭素が22.4 ml発生した。この時点でエタノールは何mg生成したか計算で求めなさい。ただし、標準状態で気体1モルの体積を22.4 lとする。また、糖度はどの程度下がったであろうか。ただし、スクロース溶液の密度は  $1 \text{ g/cm}^3$  として近似できるものとする。
3. エタノールはアセチル基をもたないのに、なぜヨードホルム反応で検出できるのか。

---

1) 酵母が沈殿するため、攪拌しないと酵母の濃度が不均一となり、測定結果に大きく影響する。  
2) 注射筒の内側で乳褐色の泡が増えていくが、内筒の先が外筒と接する位置(読むべき目盛り)がわかりにくいので、見失わないように注意する。注射筒の目盛りが40 mlを越えたら、測定をやめる。  
3) 水15 mlにヨウ素0.6 gとヨウ化カリウム1.5 gを溶かしたもの。

データ記入シート： 注射筒目盛り<sup>4)</sup>と糖度の測定値

	室温 °C <sup>6)</sup>	40 °C <sup>7)</sup>	50 °C <sup>7)</sup>	60 °C <sup>7)</sup>
0分 <sup>5)</sup>	*			
1				
2				
3				
4				
5	*			
6				
7				
8				
9				
10	*			
11				
12				
13				
14				
15	*			
16				
17				
18				
19				
20	*			
25	*			
30	*			
35	*			
40	*			

\*室温では5分おき，昇温したときは1分おきに目盛りを読むこと。

発酵後の ろ液の糖度				
---------------	--	--	--	--

発酵前のスクロース液の糖度：  . 使用した糖度計の番号<sup>8)</sup>：  .

- 
- 4) レポートで報告する気体の体積は，注射筒の目盛りから液体の体積（10 ml）を差し引いた値とする。
  - 5) 測定開始時（時間0分）の目盛りをよむ。
  - 6) 実験台の温度を測定し記録する。
  - 7) ウォーターバスの設定値だけでなく、ビーカー内のお湯の温度もデジタル温度計で測定し記録する。
  - 8) 糖度計によって値が多少違ってくるので、発酵前後の糖度の測定には同一の糖度計を用いること。