この生産量は我々の分離した菌の中 *B. subtilis* よりは劣るが水中細菌 *Pseudomonas schuyllkilliensis* Chester のそれに略匹敵する多量である。

長期培養では器壁に紅色の hefe ring があるのみで濁濁少く多量の菌体沈み, pepton 臭(培地添加)と酵母の自己消化臭とあり, 菌は死滅す。分布は酒母, もろみの初期に亘り比較的広く分離された。即ち初め我々は koji agar plate culture 上に生じた無数の酵母様 colony を添加した清酒酵母と見倣してそのまま室温(8~10°C)に放置したところ1~2週間にして漸次赤色を呈し始め, 時として全 colony が赤色を呈する事もあつた程でかなり分布の広いものである事がわかつた。然し之を 25~30°C に放置する時はその生育が衰えるのみでなく遂に赤色を呈する事はない。

要 旨

異常の状貌を呈した高温糖化酒母より *Gluconoacetobacter roseus* Asai を分離し, その諸性質, 乳酸, サリチル酸, 酒精等に対する抵抗性, 清酒酵母との混合醱酵試験を行つて之が酒母に異常の状貌を来した一原因をなす事を推論し, 又酒造経過中かなり広く *Rhodotorula* が分布し, 之が相当量の diacetyl 及び acetoin を生産する事を認めた。

清酒醸造中に消長する火落菌の発育素に就て

(第1報) その消長に就て

塚原 寅次・鴨 治儀秋・中谷 正史

(昭和 30 年 3 月 22 日受理)

Studies on the growth factors of *Bac. hyochi* showing variable growth in the course of saké brewing.

Part I. The rise and fall of the growth of *Bac. hyochi*.

By Toraji TSUKAHARA, Yoshiaki KAMOJI and Masafumi NAKATANI

(Received March. 22, 1955)

The degree of the growth of true *Bac. hyochi* (putrefactive bacteria of Japanese saké) was biologically assayed on the filtrates of the mother mash and main mash in the course of saké brewing by using "kōji" juice containing added alcohol as the basal medium. The results were as follows:—

As for the mother mash, the true *Bac. hyochi* grew scarcely before the beginning of fermentation, but it grew vigorously from the first to the main stage of fermentation. Then it decayed suddenly as the fermentation was over. As for the main mash, its growth reached the maximum at the time of high foam and decreased gradually together with its maturing.

The *Streptomyces* strains formerly isolated from certain mother mashes seemed to promote the putrefying of the main mash, but they seemed to have no important rôle concerning the growth of *Bac. hyochi*.

火落菌に関しては Atkinson¹⁾ の昔より, 鳥井²⁾, 高橋³⁾, 江田⁴⁾, 善田⁵⁾, 山崎⁶⁾, 黒野・勝目・藤田⁷⁾, 高橋・鈴木⁸⁾, 大谷⁹⁾等, 最近は下田¹⁰⁾, 福井・谷¹¹⁾, 安藤・池田¹²⁾, 田村¹³⁾, 寺本・橋田¹⁴⁾等, 幾多の研究が行われて来た。

之等の研究で最も重視されている事は火落菌の分類と, それが清酒以外には発育困難なためにその特有の発育素或は抗生物質に対する問題である。

火落菌の分類に就ては高橋¹⁾ は多数の腐敗酒より微生物を分離し, その中で通常の乳酸菌と異り清酒のみにしか繁殖出来ない菌を火落菌として *Bac. Saprogenes Saké* と命名し, 更に之を酵母水に繁殖の有無に

1) 山本: 造試報, 33, 99 (1910~12)

より2群に分けた。

其の後、山崎⁶⁾は更に全国的に火落酒を集め、94株を純粋分離し、之を麴汁への繁殖の有無等により3群に分類し、麴汁にも glucose-bouillon にも生えないものを(A)真性火落菌(72株)、麴汁に生えて glucose-bouillon に生えないものを火落菌と火落性乳酸菌の中間のものとして(B)4株、普通の培養基に容易に生えるものを火落性乳酸菌として(C)8株に分類した。更にAの真性火落菌の72株もペプトン清酒寒天 Stich や酵母水にも生えない18株を AF 100 型とし、それ以外の64株を AF 1 型として、全株を三群四類に分類した。最近応微研で北原等¹⁸⁾はこの分類を基として更に分類学的研究を進めている。

火落菌は変異が激しく微妙な菌であるが、現在迄の分類では山崎の分類がその肝片培養法や pH 等に対する研究も含めて、最も完備したものと思われる。

従つて火落菌の栄養要求等について探究する場合には供試菌が少くとも上記三群の何れに属するかを把握して後に検討しなければ無意味となる場合も予想される。

さて真性火落菌は麴汁には増殖困難であつても清酒か又は麴汁に清酒を少量添加すれば良く増殖するものである。而るに清酒醸造行程中に於て酒母の膨れ前か、或は**もろみ**でも初期の成分は清酒より寧ろ麴汁に近いものであり、それが熟成するにつれて清酒の成分に近くなるに従ひ火落菌の繁殖が可能になるものと一応考えられる。故に麴汁を基本培地として之に清酒醸造中の濾液を種々の割合に添加して、Bio-assay 的に火落菌の増殖可能の限度を決定すれば麴汁に欠除している火落菌の発育素についてはその量を知る事も可能となるわけである。

著者等は以上の考えに基いて、14%のアルコールを加えた麴汁を基本培地として普通の速醸の山麴及びビタミン B₁₂ 等も考慮して(住江・小崎¹⁵⁾、佐藤¹⁶⁾、塚原・森嶋¹⁷⁾が初めて酒母より分離した放線菌を酒母・麴汁に添加したものと計4本の酒母、**もろみ**について真性火落菌の発育の消長を追求した。

実 験

I. 酒母麴へ放線菌の添加

放線菌は塚原¹⁷⁾が酒母及び**もろみ**より分離した33株のうち予備試験において比較的に火落菌の増殖を促進すると認めた S 12 (*Streptomyces exfoliatus*) と S 14 (*St. novaecaesareae*) の2株(何れも速醸酒母より分離)を使用した。之等の放線菌は何れも蒸米に良く繁殖するので、予め三角瓶中で蒸米に純粋培養した上記2種の放線菌を混合して床揉時種麴散布直前に種麴と同量石当 40 匁添加し、以後の操作は無添加のものと同様にした。出麴の状貌は殆んど変りはないが、添加の方は放線菌特有のカビ臭に似たものが感ぜられ酒母に迄残つた。

II. 火落菌発育素の定量

Bg 5° の殺菌麴汁に同量の 28% alcohol を加え 1N-乳酸で pH 4.5 に調節し、alcohol 14% を含んだ Bg 2.5° 濃度の麴汁を基本培地とした。之を Berkfeld の濾過器で除菌し試験管に 10 cc 宛取り、之に酒母や**もろみ**の濾液を N/10 NaOH か乳酸で pH 4.5 に調節し同様に除菌濾過したものを一定量加え、更に 75°C、10 分間加熱殺菌し、ゴム栓で密栓した。即ち添加試料に対する基本培地の倍率を以て発育素の濃度とした。例えば濾液 1.1 cc は 10 倍、0.1 cc は 100 倍とした。

火落菌は火落清酒より清酒寒天高層培養法により純粋分離した桿菌であつて、山崎⁶⁾の分類法によれば真性火落菌の AF 1 型に属し、麴汁や glucose-bouillon には生えないがペプトン清酒寒天の Stich には生えて、17%のアルコールを含んだ清酒にも良く増殖し、つわり香と濁濁性強く、加水清酒中には最高 6 cc の生酸をする菌を使用した。この清酒培養をそのまま 1 白金耳接種し、27°C、10 日後に於ける繁殖、生酸可能の最高稀積度を発育素の濃度とした。火落菌が最高の生育を示した酒母湧付附近での Bio-assay の一例を示せば次表の通りである。

酒母湧付附近に於ける発育素の Bioassay (2月4日, 25日目)

濾液稀積度(倍)	10	20	30	50	75	100	対照
速醸放線菌添加	卅2.5	卅1.7	卅1.5	卅1.2	+0.9	±0.15	-0.05
" " 無添加	卅3.0	卅2.5	卅1.9	卅1.2	+0.5	-0.05	
山麴放線菌添加	卅2.4	卅2.0	卅1.5	卅1.4	+1.3	±0.23	
" " 無添加	卅2.5	卅2.0	卅1.6	卅1.4	+0.9	-0.05	

(卅, 卅, +, ±, -は濁濁度, 数字は増加酸度を示す)

III. 酒母及びもろみ中の発育素の消長

酒母は2斗5升配, **もろみ**は総米2石5斗, 同じ蒸米と麴により4本同時に仕込む。