釀 造 研 究

昭和 30 年 度

清酒醸造中に消長する火落菌の発育素に就いて

(第 2 報) 乳酸菌の完全合成培地による発育素の探究

塚原寅次・鴨治儀秋・中谷正史

(昭和 30 年 4 月 22 日受理)

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

Part 2. Investigation of the growth factors by the use of the completely synthetic medium for lactic acid bacteria.

by Toraji TSUKAHARA, Yoshiaki KAMOJI and Masafumi NAKATANI.

(Received for publication, April 22, 1955)

The true *Bac. hyochi* (putrefactive bacteria of Japanese saké) can't grow in the "Kōji" juice or in the completely synthetic medium for lactic acid bacteria, when such a medium was used separately. When small amount of the latter is added to the former, the bacteria grow rather better than in Japanese saké. As the result of investigations of effective components in this synthetic medium, it was found that while vitamins and bases had no important effects, casein hydrolyzate had the greatest effect.

It was presumed that vitamins and bases were contained in "Kōji" juice in sufficient amounts and therefor their effects were not so prominent.

火落菌の発育に就ては、その促進物質と抗生物質との両面より追求されるべきであるが、発育促進物質としては山崎¹⁾の肝臓片に始まり、高橋・鈴木²⁾の果実、野菜類、大谷³⁾の豆穀類、黒野・勝目・藤田⁴⁾の Hyotinin、更に最近は田村⁵⁾の研究や寺本・橋田⁶⁾による合成培地の発表等がある。

抗生物質としては高橋・鈴木²⁾により麹汁もアルコール醗酵性の麹菌によるものには火落菌も生えるが生酸性の麹菌による麹汁には繁殖しない事が見出され、更に最近には下田⁷⁾により麹菌の生産する火落菌の抗生物質として Oryzacidin が発見された。福井・谷⁸⁾は火落菌の Anti-Vitamin について、寺本・橋田⁶⁾はアミノ酸についてその拮抗作用を研究している。

山崎⁹⁾は清酒以外の培養基で火落菌を発育させるための研究に於て、その発育素として、(1)清酒か麹汁か酵母の古い自己消化液中にだけしか含まれまいもの、(2)肝臓やブイヨン中に豊富に含まれるもの、及び(3)清酒を活性炭素で処理して吸着されるがペプトンで代用される含N物との3つに分けたようであるが、前二者に就ては近來、田村⁵⁾によつて追求されている。

著者等は前報に於て加酒精麹汁を基本培地として、清酒醸造中の蘆液を種々の割合に加えて火落菌を接種し、その繁殖可能な稀釈限度により Bio-assay 的にその消長を追求した。

その結果、酵母及びもろみの火落菌に対する繁殖促進の作用は、膨れ頃より急激に増加し、湧付附近で最高に達し、それから漸次減少する。即ち火落菌に対する発育素、若しくは阻害物質の消長が酵母の増殖及び Alcohol 醗酵ときわめて密接な関係を持つてるように観察される。而してこの直接の原因は結局、火落菌の発育促進物質の消長によるものと考えられるので、この発育素が如何なる物質であるかを探求して見た。

火落菌が酒精添加麹汁に繁殖せず、清酒及び醗酵麹汁に繁殖するので、両者の成分上の差異を明らかにすることによりこの消長の原因を知ることが可能であると思われる。この一方法として先ず酒精添加麹汁を Basal Medium とし、これに乳酸菌の完全合成培地中の各成分を添加し、火落菌の繁殖を可能にする物質を

追求する方法をとつた。

実 験

(1) 供試火落菌

火落酒 25 種より清酒高層寒天及び清酒肝片培養を繰返し、火落菌 19 株を分離し、これらの内、17%の酒精を含む清酒中にも良く繁殖し、火落香、溷濁性及び生酸性が強く、加酒精麴汁に繁殖しない真性火落菌と認められる前報と同じ菌の 7~10 日間の新鮮清酒培養を遠心分離した後、N/15 KH₂PO₄ 液で一回洗滌し、同量の同液に suspend したものを一滴使用した。

(2) 乳酸菌の完全合成培地の添加

Besal Medium として乳酸で pH 4.6 に調整した Alcohol 14%, Bg. 2.5 の麴汁を用い、添加物質として Cooperman 等¹⁰⁾ が L. lactis, Dorner ATCC 8000 を使用してビタミン B₁₂ の Bio-assay に用いた Basal Medium に B₁₂ を添加したものを種々の割合に加え、Alcohol を 14% になるように添加し、pH 4.6 に調整し、試験管に 10 cc 宛分注し、65°C 20 分間殺菌後、前記火落菌を殺菌小ピペットで 1 滴 (0.03 cc) 接種し、ゴム栓で密栓し 28°C で培養して溷濁の程度を観察した。

第 1 表 乳酸菌の完全合成培地の添加による火落菌の繁殖

2 倍濃度 合成培地	日次 麴汁	3	5	7	10	15	2 倍濃度 合成培地	日次 麴汁	3	5	7	10	15
10.0 cc	0 cc	-	-	-	-	-	2.5 cc	7.5 cc	-	±	+	++	+++
7.5	2.5	-	-	-	±	++	0	10.0	-	-	-	-	-
5.0	5.0	-	-	±	+	+++	3 割加水清酒		-	-	±	+	++

結果は第一表の通りで、麴エキスに対して 1/4, 2/4 の添加量のものは極めて盛に繁殖し、3/4 のものは之に次ぎ、麴エキスのみ及び B₁₂ 添加 Cooperman 合成培地のみのものは全く繁殖が認められなかつた。

1/4~3/4 の何れも対照の清酒より良好な繁殖を示した。

(3) ビタミン B₁₂, 葉酸及びエチル・グリオキザル醋酸の効果

前実験の培地より B₁₂, Folic acid 及び Ethyl glyoxal 醋酸ソーダの 3 種を除いたものについて同様に実験を行つた。その結果は第 2 表に示す通りで 1/4 添加のものが最も盛んに繁殖し、2/4 のものが之に次ぎ 3/4 のものは繁殖極めて僅かで疑わしい程度であつた。

第 2 表 Vitamin B₁₂, Folic acid 及び Ethylglyoxal acetate 欠除の影響

2 倍濃度(3 者を) 合成培地(除く)	麴汁	3 日	5 日	7 日	10 日	15 日	2 倍濃度(3 者を) 合成培地(除く)	麴汁	3 日	5 日	7 日	10 日	15 日
10.0 cc	0 cc	-	-	-	-	-	2.5 cc	7.5 cc	-	-	±	+	+++
7.5	2.5	-	-	-	±	++	0	10.0	-	-	-	-	-
5.0	5.0	-	-	-	±	++	3 割加水清酒		-	-	±	+	++

(4) ビタミン類及び Base 類の効果

この麴エキスを Active にする物質が培地成分中の何れであるかを検するため、次に Vitamin 類及び Coenzyme に関係の深い Adenine, Guanine, Uracil に注目し、之等について第 3 表のような実験を行つた。

第 3 表 Vitamin 類及び Base 類の効果

	3 日	5 日	7 日	9 日	12 日	15 日
A. 麴汁に合成培地 (2 倍濃度) を 1:1 の割合で加えたもの	-	±	+	+	++	++
B. A より Vitamin 類及 Base を除いたもの	-	-	+	+	+	+
C. A より Base を除いたもの	-	-	+	+	+	+
D. 麴エキスを Vitamin 類のみを加えたもの	-	-	-	-	-	-
E. " Base 類のみ	-	-	-	-	-	-
F. " Adenine のみ	-	-	-	-	-	-
G. " Guanine のみ	-	-	-	-	-	-
H. " Uracil のみ	-	-	-	-	-	-
I. 合成培地のみ	-	-	-	-	-	-
J. 麴エキスのみ	-	-	-	-	-	-
K. 3 割加水清酒	-	±	+	+	++	++

之等も前実験と同様に Alcohol 14%, pH 4.6 に調整し、同様の方法で培養した。

その結果は第3表の通りで Vitamin 類は発育を促進するが添加しなくとも他の培地成分を加えれば相当に繁殖し、麴汁に之等のみを添加した場合には繁殖が認められなかった。

(5) Casein 分解物の効果

麴汁に Vitamin と Base を除いた合成培地を添加した培地に火落菌が繁殖することを認めたが、これは培地中の HCl Hydrolysed Casein 中に Vitamin 等の発育素が混入しているためとも考え得るので HCl Hydro. Casein を活性炭 5% にて pH 4.6 で処理したもの、及びこれを更に 1% の活性炭で処理したものを麴汁に加えて培養を行った。

この場合 Casein 分解物以外の物質を何等加えないため糖其の他発育に必要な物質が dilution されることを恐れ、Bg 2.5, Alcohol 14% の麴汁 10 cc に Casein 分触物を Cooperman 培地 (2 倍濃度) 5 cc に含まれる量を添加した。

第4表 カゼイン塩酸分解物の効果

目 次	5	7	9	11	13
麴汁 10 cc + 活性炭無処理 Casein Hydrolyzed 0.02 g	-	±	±	±	+
" + 5% 活性炭処理 "	-	(±)	±	±	+
" + 5% 処理後更に 1% 処理 "	-	(±)	±	±	+
麴 汁	-	-	-	-	-
活性炭無処理 Casein Hydrolyzed 0.04 g + 水	-	-	-	-	-
3 割加水清酒	-	+	++	++	++

Alcohol 14%, pH 4.6

培養の結果は第4表に示した通り清酒には劣るが活性炭無処理のもの、5% 処理のもの 5% 及び 1% 2 回処理のものの何れを添加した場合も多少繁殖が認められ、それぞれの間に繁殖の程度には殆んど差異は見られなかった。

尚この実験に並行して Casein 分解物を処理した活性炭に発育素が吸着されている場合を考え、処理活性炭を $\text{Ba}(\text{OH})_2$ にて pH 8.2 とし 1 昼夜放置後濾過し、濾液を H_2SO_4 で pH 3.4 にし BaSO_4 を除去後、これを麴汁に添加培養を行ったが火落菌の繁殖は認められず麴汁に対し何等 active にする作用は認められなかった。

考察及び結論

(1) 麴汁に乳酸菌の完全合成培地を添加した培地には火落菌は清酒培養以上に旺盛に繁殖する。この場合、合成培地の添加量が多過ぎると逆に繁殖し難くなることが認められる。これは麴汁に含まれる合成培地成分以外の火落菌発育素が合成培地の添加により稀釈されるためと考えられる。

(2) 合成培地成分中の Vitamin 類及び Base 類は麴汁に添加する場合には火落菌に対して繁殖促進作用はあるが決定的な要素とは認め難い。これは麴汁中には火落菌の発育に必要な Vitamin 及び Base 類は量的には不十分にしてもほぼ完全に含有されているためと考えられる。

(3) 麴汁に Casein 分解物のみを添加した培地にも相当の繁殖が認められる。

(4) この Casein 分解物の作用は Vitamin 類の混入によるものではなく、恐らく Casein 分解物中のアミノ酸によるものであると考えられる。

(本報及び前報は昭和 27 年 11 月日本醸友会大会、昭和 28 年 4 月日本農芸化学大会講演会に於て発表した。)

文 献

- (1) 山崎: 農化, 5, 377(1929)
- (2) 高橋・鈴木: 農化, 8, 1064(1932)
- (3) 大谷: 醸雑, 11, 9(1933)
- (4) 黒野・勝目・藤田: 醸試, 115, 1(1932)
- (5) 田村: 農化大会, 昭和 27 年, 28 年 4 月
- (6) 寺本・橋田: 醸雑, 31, 335; 502(1953); 32, 180; 234; 366(1954)
- (7) 下田: 農化, 25, 254(1951)
- (8) 福井・谷: 醸工, 29, 257(1951)
- (9) 山崎: 農化, 5, 399(1929)
- (10) J. M. Coeperman, et al: J. Biol. Chem, 191, 135 (1951)