糠味噌漬乳酸菌の生育に関する研究

Studies on Growth of Lactic Acid Bacteria Isoiated from "Nukamiso-zuke."

第 3 報 生麴汁中の増殖抑制物質に就て

Part 3. On a Substance Contained in the Non-boiled Koji-juice which Prolongs the Lag Period of Growth of Lactic Acid Bacteria.

(昭和 33 年 3 月 10 日受理)

西 原 さ つ き
(Satsuki Nishihara)

In the previous report, it was suggested that the non-boiled Koji-juice contained an inhibiting substance which could prolong the lag period of growth of Nukamiso Lactic acid bacteria. In this report its properties were investigated.

1. This substance was found to be extracted with butyl acetate from the non-boiled Koji-juice at pH 2.5 and transfered into sodium bicarbonate solution.

2. The inhibitory substance in the extract was lost its activity by heating for one hour in the following condition: at pH 3.0, 100°C, pH 6.8, 100°C, or pH 7.0, 60°C, respectively.

3. Koji mold could produced this inhibitory substance in surface culture of Modified Mayer medium, but not in shaking culture.

緒 言

糠味噌漬乳酸菌を麴汁に培養する場合、無煮沸汁においては 2～3 日間の生育の Lag period が見られる事については、種々の検討を加えて前報で報告したが¹⁾、この増殖誘導期の延びる原因については従来の実験の結果から考察して、麴菌の生産する物質中に求めるとすれば先ず下田氏が研究による²⁾ 火落菌の生育を抑制する "Oryzacidin" の如きを考えるべきであろう。

その構想の下に生麴汁 (pH 2.5) と醋酸ブチルで抽出したものについて実験の結果、その抽出部に明らかに前記の Lag 延長性の作用ある物質が移つて来たのを認めたのでここに報告する。

実 験 之 部

I. 実験方法

1) 増殖度の測定: 増殖度の測定は濁濁度によるべきであるが前報同様、本実験においても培養初期 2～4 日までの濁濁度と成酸度とは、ほぼ平行関係にあるので成酸度をもつてこれに代えた。但し成酸度をもつて増殖度を測る場合、煮沸しないで低温で処理した麴汁の場合は、酵素の影響が考えられるので、ここに乳酸菌無接種の生麴汁について 30°C における滴定酸度と無機磷の消長を示しておく。

経過日数	0日	1日	2日	3日	4日	5日	7日
pH	5.8	"	"	"	"	"	"
無機磷(P)	4.8	5.10	5.20	5.50	5.50	5.60	5.60
滴定酸度	0.18	"	"	"	"	"	"

無機磷は中村氏による無機磷比色定量法によつた³⁾。滴定酸度は試料 10 cc について 2 cc 容マイクロビュレットを用い、 $\frac{1}{10}$ 規定アルカリによる滴定値である。

以上に示す如く、pH、滴定酸度には変化を認めず無機磷の増加もわずかに認める程度であつた。

なお参考の為に第 1 報において用いた生糠汁での場合は下の通りである。

経過日数	0日	1日	2日	3日	4日	5日	7日
pH	5.8	"	"	"	"	"	"
無機磷(P)	18.48	24.36	29.19	30.24	31.50	31.55	32.97
滴定酸度	0.50	"	"	"	"	"	"

2) 酸度の測定: $\frac{1}{10}$ 規定アルカリにて滴定し、乳酸として算出した。

3) 培養方法: 乳酸菌は、Bllg. 10° の麴汁 10 cc に、

Koji agar の stab culture 30° 3日後のものより1白金耳量接種し、30° で3日間培養し、その1 drop (0.016~0.019 cc) を供試培養液 100 cc (容器 200 cc 容三角フラスコ) に接種し 30° で培養した。

4) 供試培養液

無煮沸麴汁(生麴汁): 麴を常法通り 55° で糖化後濾過, 煮沸処理を行わないで Bllg. 9° に調製し, Seitz 濾過器で無菌化したもの。

麴汁(麴汁): 上記 55° で糖化した麴汁を, 30 min. 煮沸後濾過, 常法により3回蒸気殺菌したもの。

無煮沸麴汁の抽出残液(生麴汁抽出残液): 下田氏の方法に従つて麴を常法通り 55° で糖化後濾過した濾液に稀 HCl を加えて pH 2.5 とし, この 1/5 容の醋酸ブチルで抽出(3回)を行つた後の残液で, 更にアルカリで pH 5.2 に戻し残液中に残る醋酸ブチルはエーテルに転溶除去し, エーテルは減圧蒸溜により除去した後, Bllg. 9°, pH 5.4 に調製して Seitz 濾過器で無菌化したもの。

無煮沸麴菌の抽出部(生麴汁抽出液): 上記ブタノール抽出部は 1/10 容の 2% 重曹水に転溶する。この液を

Table 1. 培地組成

培地	pH	酸度(乳酸として) mg%	全窒素 mg%	全糖 %
生麴汁	5.8	42	56	9.0
麴汁	5.4	63	56	8.9
生麴汁抽出残液	5.6	42	56	9.0

Fig. 1. 生麴汁抽出残液に於ける生育

再び pH 2.5 としてこの操作をさらに繰返し, pH 6.8 として使用した。

以上の方法で抽出液量は, Bllg. 10° の生麴汁 1l から抽出液 100 cc を得た。これを麴汁に添加する場合は 8:2 の割合で加え, 添加後 Seitz 濾過器で無菌化して用いた。() 内は略称。

II. 培養及びその結果

1) 生麴汁抽出残液における生育

培地として, 生麴汁の醋酸ブチル抽出を行つた残液を用い, これに糖味増漬乳酸菌 No. 40 株の培養を試みたのであるが, この場合対照として生麴汁及び麴汁での増殖を並行して行つた。

この際の培地組成は Table 1 に示し, 培養結果は Fig. 1 に示す。供試麴菌株は酒用麴菌 S₂ である。

以上で明らかな様に生麴汁抽出残液における生育 Lag は消失した。即ち, 生麴汁中の生育 Lag の原因物質は醋酸ブチルで抽出し得ると考えられる。

2) 生麴汁抽出液を同抽出残液に加えた場合の生育

次に抽出部を抽出残液に加えた生麴汁について前同様生育実験を試みた。対照として, 生麴汁, 麴汁, 生麴汁抽出残液を置いた。供試乳酸菌は No. 40 株, 供試麴菌株は酒用麴菌 S₂ である。培地組成は Table 2. に示し, 実験結果は, Fig. 2 に示す。

以上で明らかな様に抽出部を残液に加えて, 元の組成

Table 2. 培地組成

培地	pH	酸度(乳酸として) mg%	全窒素 mg%	全糖 %
生麴汁	5.8	22	45	8.5
麴汁	5.4	47	42	8.5
生麴汁抽出残液	5.6	27	48	9.4
同上 + 生麴汁抽出液	6.0	18	45	8.8

Fig. 2. 生麴汁抽出液を同抽出残液に加えた場合

に戻せば Lag は再現することが知れた。

3) 生麴汁抽出液をそのまま或は加熱後に麴汁に添加した場合の生育

培地として、抽出液を添加した麴汁及び抽出液 (pH 6.8) を 100° 1 時間加熱後添加した麴汁を用い、対照として生麴汁、麴汁、生麴汁抽出残液を用いた。供試乳酸菌株は、No. 40 株を用い、供試細菌は酒用及び味噌用の菌株を用いた。ここには味噌用の菌株での結果を報告する。培地組成は Table 3 に、培養結果は Fig. 3 に示す。

Table 3. 培地組成

培 地	pH	酸 度 (乳 酸として)	全窒素	全 糖
		mg%	mg%	%
生 麴 汁	5.8	18	42	8.3
麴 汁	5.4	47	42	7.7
生麴汁抽出残液	5.8	20	42	8.0
麴 汁 + 抽 出 液	6.0	18	42	7.8
麴 汁 + 加 熱 抽 出 液	5.8	20	42	7.7

Fig. 3. 生麴汁抽出液をそのまま或は加熱後に麴汁に添加した場合の生育

Fig. 3 に明らかな如く常法による麴汁に抽出液を添加した場合は、生育 Lag が新たに生ずることが認められるが、同一の抽出液を加熱後麴汁に添加した場合には、以上の様な Growth Lag は認められなかった。生麴汁中の生育を抑制して Lag period を延長せしめる性質の物質は醋酸ブチル抽出部に存在することが証明せられた。

4) 生麴汁抽出液の加熱の影響

文献によれば“Oryzacidin”の効果は pH と加熱温度とに著しく影響せられるので、この場合もこの点を吟

味するために生麴汁抽出液を pH 3.0 で 100°, pH 7.0 で 60°, 各 1 時間加熱後何れも pH 5.6 に戻した後麴汁に添加した。対照として生麴汁、麴汁、生麴汁抽出残液、生麴汁抽出液添加の麴汁を用いた。この場合の培地組成は Table 4, 培養結果は Fig. 4 に示す。

Table 4. 培地組成

培 地	pH	酸 度 (乳 酸として)	全窒素	全 糖
		mg%	mg%	%
生 麴 汁	5.6	36	49	9.3
麴 汁	5.6	60	49	9.3
生麴汁抽出残液	5.6	30	47	9.0
麴 汁 + 生 麴 汁 抽 出 液	5.6	30	44	8.4
麴汁+加熱抽出 液 (pH 7.0, 60° 1h)	5.6	30	43	8.4
同上 (pH 3.0, 100°, 1h)	5.6	30	43	8.4

Fig. 4. 生麴汁抽出液の加熱の影響

以上で生麴汁抽出液を pH 3.0, 100°, 1 時間, pH 7.0, 60°, 1 時間夫々加熱すれば Growth Lag を延長せしめる物質は消失することが知れた。

5) 細菌液体培養濾液の醋酸ブチル抽出液について。

細菌が液体培養においても麴の場合の如くに糖味噌漬乳酸菌の生育の Lag period を延長せしめる作用のある物質が生産せられるか否かをたしかめる為、次の様な実験を行った。

味噌用細菌株を用いて表面培養及び振盪培養による培養液を製したが、培地としては、下田氏の用いた改変 Mayer 氏液を用いた。

(表面培養の培地)

培養の経過

表面培養				振盪培養			
培養日数	pH	全糖 %	備考	培養日数	pH	全糖 %	備考
0 日	5.6	5.4		0 日	5.6	5.4	全窒素 283 mg%
3	4.8	0.867	全表面 黄色	2	4.4	2.15	
4	5.6	0.1	表面 黄色 約90% 表面 緑色 10 "	3	4.8	1.25	
5	5.6	0.08	表面 黄色 60 " 表面 緑色 40 "	5	5.2	0.57	
6	6.0	0.065	表面 黄色 50 " 表面 緑色 50 "	6	5.4	0.06	
				7	6.0	0.043	全窒素 90 mg%

Fig. 5. 麴菌液体培養濾液の醋酸ブチル抽出液について

蔗糖	2.5 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.125 g
ペプトン	1.0 g	CaHPO ₄	0.125 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g	蒸溜水	50 cc

振盪培養の培地は以上の 2 倍量を用いた。表面培養は、300 cc 容 Roux 瓶を (液の深さ 0.8 cm), 振盪培

Table 5. 培地組成

培地	pH	酸度 (乳酸として) mg%	全窒素 mg%	全糖 %
麴汁	5.4	49	42	9.0
麴汁 + 表面培養濾液 (5日間)	5.6	164	70	7.4
同上 (6日間)	5.6	200	100	8.3
麴汁 + 振盪培養濾液	5.8	310	129	6.7

養は 500 cc 容振盪フラスコを用い、常法により 3 回蒸気殺菌の後、胞子を 1 白金耳接種し、24°C で培養した。糖がほぼ消費され、pH が 6.0 近くになった時の培養液を供試した。したがって表面培養では 5 日及び 6 日を、振盪培養では 7 日を培養に要した。

これらの培養濾液を夫々 50°C 以下で濃縮し、各麴汁に添加して培養基をつくり、供試乳酸菌 No. 40 株を接種した。培地組成は、Table 5 に示した。培養結果は Fig. 5 に示す。

以上により、5~6 日間の表面培養濾液を添加すれば麴汁での Lag period は延長されるが振盪培養濾液ではこのことは認められなかった。これはその様な物質が生産されないのか、或は振盪によって分解又は他の理由で消失する為かは吟味を要する。なおこの際の培養液添加区が Lag period 後急速な生育を見るのは、表に明らかな様に窒素物の多量供給によると考えられる。

考察

前報で生麴汁に供試乳酸菌を培養する場合に見られる特有の永い生育 Lag の原因について追究した結果、この特有の Lag を与えるものは麴菌に共通した生産物と考えられ且つ加熱によつてたやすく分解するものであると知られた。この場合下田氏の報じた "Oryzacidin" の如き強力な抗菌力はないにしても、増殖開始をかなり永く抑制する点において共通した性質と考えられるので同氏に従つて抽出を試みた処、生麴汁を酸性で醋酸ブチルで抽出し、重曹転溶の方法で抽出し得ることが可能と

知つた。即ち酸性の物質であることが先ず考えられる。さらにこれを pH 3.0 で 100°, pH 5.8 で 100°, pH 7.0 で 60° 各 1 時間加熱する事によつていずれも不活性化した。

次に下田氏による改変 Mayer 培地を用いて表面培養及振盪培養を試みた結果、表面培養液には米麴の場合の如くこの生育 Lag を延長する作用を認めたが振盪培養液にはこれを認め得なかつた。このことから蔗糖を C 源とする液体培地でも表面培養すれば問題としている作用のある物質は生産されることを知り得た。

要 約

1. 生麴汁中の糖味増漬乳酸菌の増殖開始を抑制する作用の物質は、pH 2.5 で醋酸ブチルで抽出され重曹に転溶可能である。

2. この抽出液は、pH 3.0 で 100°, pH 6.8 で 100°、

pH 7.0 で 60° 各 1 時間の加熱処理によつて抑制作用を失つた。

3. 麴菌を改変 Mayer 培地に接種し、表面培養を行つた場合も、この抑制因子の生成を認めたが、振盪培養では認められなかつた。

終りに臨み、終始御懇篤な御指導を賜つた九州大学農学部山崎教授に深謝します。

(本研究の要旨は昭和 31 年 10 月、日本家政学会総会において講演した。)

文 献

- 1) 西原：栄養と食糧 9, 4, 45 (1956)
- 2) 下田：農化 25, 5, 254, (1951)
- 3) 中村：農化 24, 1~4, (1950)

(福岡女子大学家政学部)

放射線障害に対する防御剤としての沸酢酸ソーダ

X線またはγ線照射による生物体の障害に対し、あらかじめ、ある種の防御剤、例えば、システイン、システアミン等を服用または注射しておく保護作用のあることが知られている。この場合、放射性照射によつて DNA が破壊されるが、これにデスオキシリボニュクレアーゼが重要な作用を果していることが考えられる。しかし中性デスオキシリボニュクレアーゼはその作用に対して Mg イオンを必要とする。それ故、逆に Mg イオンと結合する物質を生体に与えれば、この酵素の作用が進まないで、放射線障害に対する保護作用が見られる筈となる。著者はこのような考え方に基づいて、沸酢酸ソーダ (sodium fluoroacetate) をマウスに与えた。照射 2~5 時間前に、4~5 mg/Kg の化合物を注射すると、750~775 r. の X 線 (90r./分) では無処理の方は、7 日後に 42

% が死亡したのに対し、全部が生存し、14 日後では、90%; 20%; 21 日後では、94%; 40% であつた。しかしこの注射を照射直前または直後に行つたのでは殆んど効果がなかつた。また逆に 24 時間前に与えても効果がなかつた。

しかしこの化合物は生体内では代謝され、fluorocitrate となるが、このものがトリカルボン酸サイクル中のアコニターゼに対して競合阻害剤である点に注意しなければならない。

Sodium Fluoroacetate as a Protecting Agent against Irradiation.

by Z.M. Aacq, P. Fischer, A. Herve,
C. Liébecq and S. Liébecq-Hutter
Nature, 182, 175~6 (1958)

パインアップル罐詰のビタミン B₆ について

ハワイ産の 5 種の罐詰パインアップル・ジュースと、5 種のパインアップル罐詰について B₆ の含有量を検討した。試料を 0.06N H₂SO₄ 中 15 lbs. で 2 時間加圧加熱した後、微生物定量を行つた。その結果、ジュースは 0.080~0.125 (平均 0.096)、パインアップルは 0.061~0.082 (平均 0.071) mg% であり、1953 年に行われた罐詰食品

の検査の報告はジュース 0.33、パインアップル 0.077 mg % で、ジュースの含有量が、修正さるべきと考えられる。

Vitamin B₆ in canned pineapple products L. J. Tepley: Food Res., 23, 327 (1958)

(五十嵐)