- (6) O.H.LOWRY, O.A.BESSEY: *J. Biol. Chem.*, 155, 71 (1944).
 (7) F.M.STRONG, R.E.FEENEY, B.MOORE, H.T.PARSON, : *J. Biol. Chem.*, 137, 363 (1941).
 (8) M.I.WEGNER, A.R.KEMMERER, G.S.FRAPS: *J. Biol. Chem.*, 146, 547 (1942).

Summary

Fundamental experiments were carried out for the purpose of the application of microbiological assay for riboflavin reported by E. E. SNELL to the contents of the gastrointestinal tracts and feces. The results obtained are as follows:

1. The acid production by *L. casei* can be affected not only by the amount of riboflavin, but also by other materials, even by the amounts of nutrients. Therefore, on the occasion of the application of this method, it is especially desirable to examine whether this method can be applied to the material to be assayed, or not.

2. This method can be applied to the feces and the contents of small intestine of the rabbit, but cannot be applied to the contents of cecum and rumen.

溜醸造に關与する麹菌の研究 (第 2 報)

麹酸生成能否による分類 (第 1 報補遺)

小 原 巖 (岐阜大学農学部)

昭和 27 年 6 月 4 日 受理

Classification of *Aspergillus tamaris-oryzae* Group. Part 2. The Production of Kojic Acid from Various Compounds as an Aid for Identification.

(Supplement to Part 1)

By Yuwao OHARA (Coll. of Agr., Gifu Univ.)

従来いわゆる麹菌(黒麹菌を除く)には菌叢の色で黄緑色種(花麹菌), 青色種, 褐色種, 白色種等あり, 又酒麹菌, 味噌菌, 醤油菌, 溜麹菌, 焼酎用菌等の区別があるばかりでなく, 形態的並びに生理的性質の異なる多数の菌株が知られているが, それらの多くは単に *Aspergillus oryzae* として報告され, 総て *A. oryzae* (AHLB.) COHN に属するものとは見做されないが, 少くとも THOM 等⁽⁴⁾⁽⁵⁾ の *A. flavus-oryzae* Group に属するものと考えられて来た. THOM & RAPER⁽⁵⁾ は *A. flavus-oryzae* Group に *A. oryzae* (AHLB.) COHN, *A. flavus* LINK, *A. parasiticus* SPEARE, *A. micro-virido-citrinus* COST. et LUCET, *A. effusus* TIRAB. の 5 species を挙げてゐるが, 坂口, 山田⁽²⁾ は *A. oryzae* WEHMER (*A. oryzae* s.str.) の他に *A. oryzae* var. *fulvus* TAKAHASHI et YAMAMOTO, *A. oryzae* var. *microsporus*, *A. oryzae* var. *globosus*, *A. oryzae* var. *magnusporus* SAKAGUCHI et YAMADA の 4 変種を大別すると同時に *A. sojae* SAK. et YAM. を区別しいわゆる麹菌には THOM 等の *A. flavus-oryzae* Group に編入されないもののあることを指摘した.

著者は *A. oryzae* (WEHMER) SAK. et YAM. を尚いくつかの subspecies に分類した方が便利であると考え, さきに⁽¹⁾溜麹その他から分離した 45 株の麹菌を既知菌株と比較し, 尚各種炭素源から麹酸を生成する可否を検査した結果, 形態学的性質のみでは分類が困難であるこれらの菌株を比較的容易に分類することの出来る分類表 (Key) を造り *A. sojae* SAK. et YAM. を *A. parasiticus* SPEARE 及び *A. tamaris-oryzae* KITA と共に *A. tamaris-oryzae* series とし *A. oryzae* 及びその変種と区別すると同時にそれらの全部を抱括する *A. tamaris-oryzae* Group を設け, それが溜の麹菌ばかりでなく広く本邦産のいわゆる麹菌を全部抱括し得るものであることを推定したが, 其の後新たに岐阜県下の溜醸造場から 24 株 (Table 1 a) を分離し, 尚醸造試験所より褐色麹菌等 10 株, 長尾研究所より *A. effusus* TIRAB. 等 3 株, 東大坂口研究室より復便の麹菌 3 株⁽³⁾ (Table 1 b) を分離されたので, それらに就て第 1 報⁽¹⁾ と同様の方法で試験した結果 (Table 2, 3) 尚新たに *A. oryzae* の変種を設ける等, 既報の分類表の一部を改訂したので第 1 報の補遺としてその概要を報告する.

供試菌 151 株 (内 111 株は既報⁽¹⁾) 全部の観察結果を綜合し, 既報の分類表を次のように改訂した. 即ち *A. effusus* TIRAB. (NI 5560) には類縁菌がなく *A. oryzae* の変種としたことには無理があるので訂正し, 麹菌

Table 1 a. Source of Cultures (Isolated by the author)

Isolate	Source
KM9, KK35, KK36	笠松町, 杉山商店
KM10, KM11	大垣市, 小寺商店
KK21, KK22	岐阜市, 貝崎商店
KK23-1, KK23-2, KK24	" 高野商店
KK25-1, KK25-2, KK26-1, KK26-2	八百津町, 味噌平醸造
KK27, KK28, KK29, KK30	古川町, 関甚商店
KK31	竹鼻町, 井三商店
KK32-1, KK32-2	" 田中忠雄
KK33, KK34-1, KK34-2	笠松町, 伊藤太八

Table 1 b. Source of Cultures.

Isolate	Source	Received as
A24-1, A24-2, A3-2	FAT	<i>A. flavus</i> LINK
5327	NI	<i>A. tamarii</i> KITA
5560	"	<i>A. effusus</i> TIRABOSHI
5310	"	<i>A. pseudothamni</i> SAITO
J46, J47, J48, J49, J54	GIB	unidentified
J59, J64, J208,	"	"
B, 合K	Miso	"
FAT: Mr. H. IZUKA, Faculty of Agr., Univ. of Tokyo.		
NI: Dr. K. KOMINAMI, Nagao Institute, Tokyo.		
GIB: Mr. H. MURAKAMI, Government Institute of Breeding, Tokyo.		

Table 2. Cultural and Microscopical Characteristics

Isolate	Colonies on Czapek's soln. agar									Microscopical Characteristics						
	Color No. (1) after (days)			Appearance				Diameter (mm) after (days)			Head	Stalk		Conidia		Blase (μ)
	1	2	3	Surface	Reverse			1	2	3		wall	(mm)	wall	(μ)	
					c	r	y									
KK 21	67	75	70	v	c	r	y	7	23	36	col.	R	0.4	R	4.7	16-28(20)
22	75	79	89	//	//	s	w	3	16	28	//	//	§ 0.5	//	4.7	24-38(33)
23-1	67	62	70	f	//	//	y	5	17	30	//	//	§ 1.3	R S	4.7	31-38(34)
23-2	67	75	88	v	//	//	//	6	23	36	//	R R	0.4	//	4.2	19-31(24)
24	75	88	88	//	//	//	w	5	16	28	//	S R	0.4	//	4.5	28-40(35)
25-1	1	77	77	//	//	//	//	6	20	29	glb.	R R	0.8	//	8.6	28-45(35)
25-2	76	65	65	f	//	//	y	4	17	28	rad.	//	§ 1.7	S R	5.7	26-45(37)
26-1	76	77	89	v	//	//	//	5	21	29	col.	R S	0.3	R S	4.0	26-43(32)
26-2	76	89	89	//	//	//	//	5	20	36	//	//	0.3	//	4.0	24-31(27)
27	67	75	89	//	//	r	//	5	23	35	glb.	R	0.3	R	5.4	19-31(22)
28	75	72	77	//	//	//	//	5	23	36	blm.	//	0.4	//	4.8	23-35(27)
29	59	75	65	f	//	s	//	5	15	28	rad.	R R	1.3	R S	4.7	35-47(41)
30	74	76	77	v	//	r	//	6	21	36	col.	S R	0.3	R	5.2	17-49(29)
31	76	77	77	//	//	s	//	6	23	37	//	F	0.3	//	4.7	16-21(19)
32-1	67	75	79	//	//	r	//	5	19	32	//	//	0.4	//	4.9	19-28(23)
32-2	74	79	65	f	//	s	w	6	21	33	//	S R	§ 0.8	//	6.4	19-31(26)
33	67	75	77	v	//	r	y	8	17	35	//	R	0.3	//	5.2	19-28(25)
34-1	75	77	77	//	c	s	w	7	16	34	//	R	0.4	//	4.5	19-35(33)
34-2	76	77	89	//	//	r	y	8	22	34	//	//	0.3	//	4.0	21-33(27)
35	74	76	78	//	l	s	w	6	13	26	rad.	R R	1.2	//	5.7	42-54(43)
36	74	77	77	//	c	r	y	9	18	43	col.	//	0.2	//	4.2	16-31(21)
KM-9	76	77	79	//	//	s	//	8	18	34	//	//	0.4	//	4.0	23-38(33)
10	65	77	77	//	//	//	//	7	19	36	//	R S	0.3	//	4.22	4-36(28)
11	75	79	79	//	//	r	//	7	17	41	//	R	0.7	R S	4.8	17-36(26)
46	62	65	70	//	l	s	w	5	19	33	rad.	//	§ 1.9	P	5.3	30-43(37)
47	60	65	70	//	c	//	//	6	18	32	blm.	//	1.2	T	5.4	38-54(43)
48	70	70	70	f	//	//	//	5	18	30	//	R R	0.3	//	5.3	24-50(38)
49	69	64	64	//	//	//	//	6	23	37	rad.	R	§ 1.7	//	6.3	26-38(31)
54	74	77	78	v	//	//	//	4	18	30	//	//	§ 0.7	//	5.4	24-33(30)
59	69	63	64	//	//	//	y	7	23	40	//	R S	§ 1.4	//	6.0	28-43(34)
64	75	77	77	f	//	//	//	9	21	36	col.	R R	§ 1.9	//	5.7	24-45(32)
208	63	63	63	v	//	//	w	7	24	37	rad.	S R	§ 2.1	//	6.0	35-59(49)
Miso B	1	75	75	f	//	//	y	6	12	27	glb.	R	2.5	R	5.3	30-40(35)
合 K	72	89	78	v	//	//	//	4	17	29	rad.	R S	1.0	T	6.6	14-19(16)
A24-1	76	77	79	//	c	s	//	4	19	28	col.	//	0.9	R S	4.1	33-47(39)
A24-2	75	88	79	//	//	r	//	5	19	35	//	R	1.0	R	4.4	21-40(29)
A3-2	74	71	79	//	l	s	//	6	23	38	//	//	1.5	//	4.6	33-43(35)
NI5310	1	74	64	f	//	//	//	6	23	38	//	//	1.7	S	4.9	9-19(15)
5327	62	75	46	v	c	//	w	5	22	35	glb.	//	0.3	//	4.2	17-28(20)
5560	1	87	62	f	//	//	//	5	24	40	//	//	2.6	//	4.0	16-26(20)

f : floccose, v : velvety, c : compact, l : loose, s : smooth, r : rugose, w : white, y : yellowish, rad : radiate, glb : globose, col : columnar, blm : bloom-like, fas : fasciculate, R : roughened, S : almost smooth, RS : delicately roughened, SR : more or less roughened, RR : granuliferous, T : tuberculate, P : pitted, § secondary conidiophores born in the stalks.

Table 3. Amount of Kojic Acid produced from Various Compounds.
Observations were made on seventh day after inoculation, incubation temp. 30°C.

Compounds	KK 21	22	23-1	23-2	24	25-1	25-2	26-1	26-2	27	28	29	30	31	32-1	32-2	33	34-1	34-2	35	36	9	10	11	46	47	48	54	64	食K	24-1	24-3	3-2	NI 5327
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	KM	-	-	J	-	-	-	+	-	A	-	-	NI
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Alcohol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
KNO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KNO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koji Ext.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Kojic acid not produced by following strains after 7 days incubation at 30°C :

J 49, J 59, J 208, Miso B, NI 5310, NI 5560.

を互にその性質が連続的に変化している多数の菌種の集合とすれば *A. tamarai* KITA と *A. effusus* TIRAB. はその最両端に位するものであるとした。又既報の *A. oryzae* var. *pseudoflavus* (SAITO) OHARA, Group A の内特に短毛で而も blase の小さいものを *A. oryzae* var. *micro-vesiculosus* n. var., 中短毛でやや blase の大きいものを *A. oryzae* var. *tennis* n. var. とし、従つて *A. oryzae* var. *pseudoflavus* (SAITO) OHARA は Group B のみとなるので 2 群に区別することを止めた。THOM & RAPER⁽⁶⁾ の *A. flavus* LINK には複数の菌株が多数包括されるが、それ等の内には相互にかなり性質の異なるものがあるので *A. oryzae* var. *globosus* SAK. et YAM. 及び新たに設けた *A. oryzae* var. *variabilis* (GASP.) n. comb. 等に編入されたものを除外し *A. flavus* LINK s. str. とした。尙 *A. tamarai* KITA に属するもので短毛菌 (Group A) と長毛菌 (Group B) を区別し、*A. oryzae* (AHLB.) COHN に属するものの内で短毛 (1mm 以下) のものを新たに Group C として区別した。*A. micro-viridocitrinus* COST. et LUCET は文献上の記載からは *A. oryzae* var. *tennis* n. var. に最も近いが、其の関係は Type culture を入手した上の研究に俟つこととした。

Analytical Key to the Series, Species and Subspecies of the

Aspergillus tamarai-oryzae Group. (revised)

I. Conidia tuberculate ; Heads in brownish to deep green color.

(Starch almost unhydrolyzed)

A. tamarai-sojæ series

A. Heads radiate or globose, sometimes bloom-like. (Sucrose -)*

1. Colony color in brown shades.

a. Stalks almost smooth.

b. Stalks under 1 mm ; Vesicles under 30 μ . 1a. *A. tamarai* KITA, Group A n. subdiv.

bb. Stalks up to 5 mm long ;

Vesicles mostly over 40 μ .

1b. *A. tamarai* KITA, Group B n. subdiv.

aa. Stalks roughened.

2. *A. tamarai* var. *crassus* OHARA

2. Colony color in deep green.

a. Stalks almost smooth ; less than 1 mm in length. 3. *A. sojae* SAKAGUCHI et YAMADA

aa. Stalks roughened, rather granuliferous. 4. *A. sojae* var. *gymnosardae* (YUKAWA) OH.

B. Heads loosely packed in columnar masses or irregularly radiated ; Vesicles mostly under 30 μ ; Stalks often born as short branches. (Sucrose : +)

1. Stalks almost smooth. (Galactose : -) 5. *A. parasiticus* SPEARE

* Kojic acid produced (+) or not produced (-) from sucrose.

2. Stalks roughened, sometimes granuliferous.
(Galactose : +) 6. *A. parasiticus* var. *rugosus* OHARA
- II. Conidia roughened without tuberculs.
Heads in yellowish green color. *A. flavus-oryzae minor series*
- A. Stalks roughened. (Sucrose : +)
1. Stalks mostly under 0.5 mm, often septate ;
Conidia mostly under 6 μ ; (Fructose : -)
Vesicles mostly over 30 μ 7. *A. oryzae* var. *sporoflavus* OHARA
2. Stalks mostly under 1 mm, often born as short branches ;
Conidia mostly under 5 μ ; (Fructose : -)
Vesicles mostly under 40 μ . 8. *A. oryzae* var. *microsporus* SAK. et YAM.
3. Stalks over 1 mm ; Vesicles mostly over 40 μ ;
Sterigmata occasionally in two series. (Fructose : +) 9. *A. oryzae* var. *globosus* SAK. et YAM.
- B. Stalks almost smooth, sometimes delicately roughened near the vesicles. (Sucrose : -)
1. Stalks mostly under 0.5 mm ;
Vesicles mostly under 30 μ . 10. *A. oryzae* var. *wehmeri* (C. et L.) OH.
2. Stalks up to 1 mm long.
a. Vesicles mostly under 30 μ ;
Conidia mostly over 6 μ . 11. *A. oryzae* var. *magnasporus* SAK. et YAM.
- aa. Vesicles mostly over 30 μ ; Conidia mostly under 6 μ ;
Sterigmata occasionally in two series. 12. *A. flavus* LINK s. str.
- III. Conidia almost smooth or delicately roughened ; Stalks often granuliferous ;
Heads in greenish yellow color. *A. flavus-oryzae major series*
- A. Heads globose or radiate. (Sucrose : +)
1. Stalks up to 4 mm long ;
Vesicles mostly over 30 μ . 13a. *A. oryzae* (AHLB.) COHN, Group A. OHARA
2. Stalks up to 2 mm long ;
Vesicles mostly over 40 μ . 13b. *A. oryzae* (AHLB.) COHN, Group B OHARA
3. Stalks up to 1 mm long ;
Vesicles mostly under 30 μ . 13c. *A. oryzae* (AHLB.) COHN, Group C n. subdiv.
- B. Heads loosely packed in columns or fasciculate. (Sucrose : -)
1. Stalks mostly under 1 mm ;
Vesicles mostly under 20 μ . 14. *A. oryzae* var. *microvesiculosus* n. var.
2. Stalks mostly over 1 mm.
a. Vesicles mostly under 40 μ . 15. *A. oryzae* var. *tenuis* n. var.
- aa. Vesicles mostly over 40 μ ;
Sterigmata often in two series. 16. *A. oryzae* var. *variabilis* (GASP.) n. comb.
3. Stalks mostly over 2 mm.
a. Vesicles mostly under 20 μ . 17. *A. oryzae* var. *pseudoflavus* (SAITO) OHARA
- aa. Vesicles mostly under 40 μ ;
Sterigmata usually in two series. 18. *A. effusus* TIRABOSCHI

供試菌を、溜醸造に關与する麹菌として著者の分離したもの (A) と、主として種麹から分離され各研究所に保存されたもの (B) 及び菌名既知の菌株として分譲されたもの (C) に分け各株の所屬を決定した結果を菌株数で表示すれば Table 4 の如く、A には *A. tamarii* KITA は発見されず大部分が conidia 粗面の短毛菌 (主として *A. oryzae* var. *microsporus* SAK. et YAM.) であつた。 *A. oryzae* (AHLB.) COHN が案外に多いことは、溜にも味噌醬油と同じ市販種麹を使用していることに起因するものであろう。

総 括

主として岐阜県下の溜醸造場に於て溜麹その他から分離した麹菌と各研究所より分譲された菌株等合計 151 株に就き形態学的性質を観察すると共に sucrose その他の炭素源から麴酸を生成するか否かを試験した結果、新たに 6 つの subspecies を設けるなど既報の分類表を一部改訂した。

黒麹菌を除く所謂麹菌を *A. tamarii* KITA より *A. effusus* TIRAB. までその性質が連続的に変化している

Table 4. Number of Cultures Identified.

Species or Varieties	Number of Strains*				Species or Varieties	Number of Strains			
	A	B	C	Total		A	B	C	Total
1. <i>Aspergillus tamarii</i>	0	2	3	5	10. <i>A.oryzae</i> var. <i>wehmeri</i>	8	2	1	11
2. <i>A.tamarii</i> var. <i>crassus</i>	0	4	2	6	11. <i>A.oryzae</i> var. <i>magnasporus</i>	0	2	2	4
3. <i>A.sojae</i>	2	2	1	5	12. <i>A.flavus</i> s. str.	2	6	1	9
4. <i>A.sjae</i> var. <i>gymnosardae</i>	0	3	1	4	13. <i>A.oryzae</i>	8	7	3	18
5. <i>A.parasiticus</i>	1	1	3	5	14. <i>A.oryzae</i> var. <i>microvesiculosus</i>	3	1	5	9
6. <i>A.parasiticus</i> var. <i>rugosus</i>	0	0	1	1	15. <i>A.oryzae</i> var. <i>tenuis</i>	2	2	6	10
7. <i>A.oryzae</i> var. <i>sporoflavus</i>	5	0	0	5	16. <i>A.oryzae</i> var. <i>variabilis</i>	2	2	0	4
8. <i>A.oryzae</i> var. <i>microsporus</i>	33	5	2	40	17. <i>A.oryzae</i> var. <i>pseudoflavus</i>	0	0	5	5
9. <i>A.oryzae</i> var. <i>globosus</i>	3	3	3	9	18. <i>A.effusus</i>	0	0	1	1
						69	42	40	151

* A: 45 strains (Table 1a in Part 1) and 24 strains (Table 1a in this paper), isolated by the author from a sort of soy bean Koji for making Tamari soysauce and soy bean paste.

B: 32 strains (Table 1b in Part 1) and 10 strains (Table 1b in this paper), received as unidentified.

C: 34 strains (Table 1c in Part 1) and 6 strains (Table 1b in this paper), received as hitherto known strains.

多数の菌を総称するものと考え、それを *A. tamarii-oryzae* Group とし、その大半を *A. oryzae* の変種と見做した。

溜醸造に関する麹菌は主として *A.oryzae* var. *microsporus* SAK. et YAM. であることを明らかにした。

終に臨み御高教を賜った東大坂口謹一郎教授並に菌株を分譲された小南清博士、村上英也氏、飯塚広氏及び試料をいただいた各醸造家に対し深謝致します。尙実験の一部は津村幸男、小野崎博通、栗本末弘の諸君の助力によることを附記して感謝の意を表します。

本研究の費用は一部を文部省科学研究費に仰いだ。

- (1) 小原：岐阜大農報，1，72 (1951)。
- (2) 坂口，山田：農化，20，65；141 (1944)。
- (3) 坂口，飯塚，岡本：農化，25，79 (1951)。
- (4) THOM, C. and CHURCH, M.: The As-

- pergilli, Baltimore (1926).
- (5) THOM, C. and RAPER, K. B. A Manual of the Aspergilli, Baltimore (1945).

Summary

In the preceding paper, the author introduced an analytical key to the *Aspergillus tamarii-oryzae* group and it was stated that the ability to produce kojic acid from various compounds in the chemically defined medium could aid species and varieties identification which was difficult when based on the evaluation of the cultural and morphological characteristics.

In this paper, investigations have been made on more forty strains (Table 1a, b) and some changes made in the key which should include all the strains of yellowish green to brownish Aspergilli.