麦酒酵母の凝集形成に関する研究 (第 3 報) 日本在来種 (六条種)

麦汁の主醱酵に際し麦酒酵母が早期異常に凝集を起す現象に就て

工 藤 四 郎 (麒麟科学研究所)

昭和 27 年 7 月 23 日 受理

Über die Bruchbildung der Brauerei Hefe. III. Mitteil. Über abnormales Gärbild, welches bei der Hauptgärung frühzeitig die Bruchbildung der Hefe verursacht, wenn man japanische 6 zeilige Malze statt der 2 zeiligen verwendet.

Von Shiro Kudo (Kirin Institut für Brauerei)

第 1 報に於て、在来種麦汁の主醱酵に於て現われる異常な Bruchbildung の醱酵様相が、忽布煮沸、接種量、培養温度、単なる窒素或は糖含量、pH 等には大なる関係を有せざる如く考察され、該培地がゴールデン種の其れに比し、一般成分の量的相違に依るのでないであろう事が、ほぼ推察されたが、積極的に特殊な成分が存在し、或は欠除しているためか否か、判然としなかつた。たまたま麦汁調製の際、過つて最終煮沸 (abmaischen) の温度を 80° 以上に上昇せしめた事があり、其れの醱酵試験に於ては、酵母の凝集及び Bllg. の切れの停止がより強く現われた事を経験した。此の事実より、糖化の温度や時間、並に麦芽粕 (Malz Treber) の影響が何等か、在来種の特異性に關係を有するのではないかという点に思い至つた。麦芽粕乃至麦芽殻皮 (Spelzen, Hülse) の麦酒に及ぼす影響⁽¹⁾に就ては古くより論じられ、Moufang⁽²⁾ (1928) は Spelzen 中の Testinsäure は酵母を変質せしめると述べ、Schönfeld⁽³⁾ (1928) は Spelzen を除いた麦汁で酵母を培養すると Staubform にするといひ、Reinhard⁽⁴⁾ (1937) は、かかる変化を認められなかつたと述べている。当社に於ては河相氏⁽⁵⁾は、Hülse は在来種の特異性の原因ではないであろうとし、山口氏⁽⁶⁾は、其の特異性は在来種麦芽の Spelzen に原因があるとした。著者も嘗て之を追試し、Spelzen の影響大なるを見た。

実 験

醱酵試験法：第 1 報の通り。

I. 仕込温度 (Temp. bei Maisch-Verfahren) の影響に就て 麦汁調製に於ける Kongress 法は Infusion であり、現場に於ける如き Dekoktion 法とは趣を異にするが、前者の糖化方法に於ても、在来種は特有な性質を現わす事から、取敢えず Kongress 法に準じ、正規の糖化法を行つたものと、初め 60° から出発する高温短期

Tabelle 1.

仕込法 (Hoch Kurz Maischen) を比較した (Tabelle 1)

Malz Maisch Verfahren Datum Temp.	Golden Normales Bllg.	Zairai Hochkurzes	結果、高温短期仕込区は、糖化時間短く麦汁組成の劣る事が当然考えられ、両重共其れに比例して Bllg. の切れは劣つてゐるが、在来種は依然として、特有な液の澄み方を呈し、Bllg. の低下度を示している。即ち在来種の特異性は、糖化温度 45°~60° の所謂蛋白休止
7.13, 15u Zimmer	12.2°	12.2°	12.4° 12.3°
7.14, 10u 9.5°C	10.5	10.5	10.4 10.3
7.15, 17u 4.5°	3.7	5.25	4.7 5.3
7.20, 9u 3.7°	3.1	4.45	3.95 4.7

期間 (Eiweiss Rast) には大なる関係を有せざる如く考察される反面、Bllg. の切れに対する高温短期仕込法の影響は、ゴールデン種は在来種に比し、大なる事が観察されたところから、Eiweiss Rast は両種の差異を大にしている事も考えられる。

II. 仕込時に於ける最終煮沸 (Abmaisch) の影響 前実験で在来種の特異性は、比較的低い糖化温度 (45°~60°) の期間は、余り関与しないであろう事が考察されたので、比較的高い温度 (60°~80°), 特に abmaischen の影響を検討した。両種に就いて、abmaischen を行えるものと、行わざるもの (共に忽布煮沸は行わず) を比較醱酵試験を行つた結果 (Tabelle 2) 両種共 abmaischen を行わざる区は、酵母の醱酵、増殖共良好にして、在来種にあつては、著しく特異性は消失し、ゴールデン種の abmaischen を行える区に比し、同程度以上に醱酵は改善されている。

然しながら abmaischen を行わざる区同志を比較すると、依然在来種はゴールデン種に対する劣性を示してい

る。以上の事実から、在来種の特異性は、abmaischen の操作に至大の関係があり、在来種麦芽中に酵母の凝集を異常に促進せしむる因子が存在するとせば、其れは 80° の如き高温でよく溶出されるものであるか、或は abmaischen を行わぬ事は酵素類を麦汁中

Tabelle 2.

Malz abmaisch Verfahren	Datum Temp.	Golden		Zairai	
		+	-	+	-
		Bllg.			
6.6 10 ^u Zimm.		12.0	12.0	12.0	12.0
6.7 17 ^u 8.6°		7.2 (0.5)	7.8 (-)	7.4 (1.0)	7.9 (0.7)
6.8 9 ^u 8.2°		4.7 (7.0)	5.7 (0.7)	5.4 (8.0)	5.6 (7.0)
6.9 11 ^u 9.2°		2.65 (12.8)	2.3 (10.5)	4.0 (11.5)	3.3 (11.9)
6.1 11 ^u 8.3°		2.5 (11.9)	1.15 (12.0)	3.4 (12.0)	2.15 (14.0)

Bemerk: () = Hefe Menge von Boden-Satz (c.c.)

Fig. 1. —→ Zeit in Tage

に残存せしめる事であり、酵素が二次的に培地又は酵母に対し、好影響を及ぼすものかと考えられる。

Ⅲ. 麦汁煮沸 (Würze Kochen) の影響 前実験で在来種の特異性は abmaischen の操作に至大の関係を有する事を知つたが、第1報に於て、忽布煮沸操作は、特異性に無関係にある事を観察した点から、麦汁を単に 80° 以上に晒す事は、麦汁中に Treber が存在するか否かで、特異性発現に相違を来すのではないかと考えられる。両種麦芽を準 Kongress 法で糖化後、Treber を除去せず、其の儘 1st. 煮沸を行いしものと、Treber を濾別し、1st. 煮沸を行いしものと比較醸酵試験を試みし結果 (Tabelle 3), Treber を除き煮沸を行いし区は、無煮沸区に比し、両種麦汁共増殖乃至醸酵が阻害される傾向を見せた。ところが Treber を除去せず煮沸を行いしものは、両種共明かに酵母凝集を促進し、Bllg. の切れも悪化している。Treber より煮沸に依り溶出して来る成分のため、Tabelle 3 に見らるゝ如く、Vorder-Würze の Bllg. は高い。Bllg. 12° に規正せる Stamm Würze は当然対照に比し、培地の栄養組成が劣り、凝集促進に対する何等酵母の生理的要因を形成するのではないかと

Tabelle 3.

Versuch Nr. Malz Kochen mit Treber	Datum Temp.	1	2	3	4	5	6
		Golden -	Zairai -	Golden +	Zairai +	Golden +	Zairai +
7.14. 16 ^u Zimm.		12.2	12.2	11.8	11.8	12.1	12.1
7.15. 10 ^u 12°C		8.4	8.9	9.15	8.9	8.4	8.9
14 ^u 3.5°		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
15 ^u 3.5°		7.6	8.15	8.45	8.4	7.7	8.45
7.15. 10 ^u 2.9°		(-)	(9.0)	(-)	(8.8)	(10.5)	(13.0)
7.20. 20 ^u 3.7°		5.8	6.65	6.9	7.2	5.95	7.2
		(5.9)	(7.9)	(2.9)	(6.3)	(8.9)	(7.5)
		3.65	5.4	4.65	6.2	5.1	6.9
		(9.4)	(8.2)	(7.7)	(7.2)	(9.3)	(9.5)
Bllg.							
Vorder Würze		19.2	18.4			23.8	22.2
Endvergärun- grad (%)		85.3	81.5			85.0	80.8

Tabelle 4.

Versuch Nr.	Stamm Würze		Endvergorene Würze		Vergärun- grad von	
	Gesamt Zucker	Red. Zucker	Gesamt Zucker	Red. Zucker	Gesamt Zucker	Red. Zucker
1	11.30	9.38	2.91	0.74	74.2	92.1
2	11.45	8.43	3.19	0.80	72.0	90.4
5	10.95	8.84	3.01	0.82	72.5	90.6
6	11.51	8.54	3.45	0.86	70.0	89.9

Bemerk. : Gesamt. Zucker ist als Glucose,
Red. Zucker ist als Maltose berechnet

とも考えられる。然しながら最終醸酵度⁽⁶⁾ (Endvergärungsgrad) は Tabelle 3 に見らるゝ如く、両種共 Treber 煮沸区は、対照区に比し、僅に (0.3~0.7%) 低下しているのみであり、糖消費率から見ても 0.6~1.5% の差を示すにすぎない (Tabelle 4)。然るに醸酵経過、例えば 6 日目の見掛け醸酵度⁽⁶⁾ を比較すると、ゴールドン種では 14.5%、在来種では 17.4% もの開きを示すのである。この事実から Treber を高温に晒す事が在来種の特異性に絶大な関係をもち、abmaischen の操作も、Treber が主役を演じている事が考えられる。在来種中に酵母を異常に凝集せしむる因子が存在すると考えるならば、Treber を高温で浸出せしむると、非常によく溶出して来る

ものであり、其れは煮沸に依つても変化せず、又ゴールデン種にも程度の差こそあれ、其の傾向の見らるゝところから在来種の特異性は、在来種特有のものでなく、ゴールデン種にも存在すると考える事が出来る。

IV. **Treber の影響** 前実験で在来種の特異性は Treber を麦汁と共に高温に加熱する時に著しく発現する事を見た。今回は、準 Kongress 法により糖化後、木綿布を用い麦汁を濾過、残存する Treber に熱水を加え、1 時間煮沸して濾過せる抽出液を、兩種麦汁に交互に加え、酸酵試験を行つて見た (Tabelle 5) 結果、兩種の Treber 抽出液共、特異性の

Tabelle 5

Würze Treber Ext.		Golden —	Zairai —	Golden Golden's Zairai's		Zairai Golden's Zairai's	
Datum	Temp.						
7.14. 16 ^u	Zimm.	12.2	12.2	12.0	12.0	12.0	12.0
		8.4	8.9	9.4	9.4	9.2	9.3
7.15. 10 ^u	12°C	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(1.8)
		(—)	(7.0)	(1.5)	(12.0)	(5.0)	(19.0)
	14 ^u	7.6	8.15	8.4	8.4	8.4	8.5
	3.5°	(—)	(9.0)	(1.9)	(16.0)	(9.0)	(10.0)
	17 ^u	5.7	6.65	6.35	6.45	6.6	7.1
		(5.9)	(7.9)	(8.0)	(10.5)	(8.7)	(9.8)
7.17. 10 ^u	2.7°	3.65	5.4	4.0	4.9	5.3	6.1
		(9.4)	(8.2)	(9.7)	(10.5)	(8.5)	(10.5)
7.20. 10 ^u	3.7°						

発現に關与している事が見られるが、在来種の其れは特に顕著であり、之に反しゴールデン種の其れは微弱である。其れはゴールデン種麦汁に添加した場合は若干の影響を与えているが、在来種

麦汁に添加しても、殆ど影響を与えていない。この事実から、Treber の熱水抽出液中には、在来種の特異性を発現する因子が含まれ、在来種の其れは、顕著に存在し、煮沸により容易に浸出して来る事が、ほぼ確実となつた。而して在来種中には其れが多量に含まるゝものであるか、質的に異つた発現因子があるのではないかと云う推論に到達した。

V. **麦芽殻皮 (Spelzen, Hülse) の影響** 前実験に於て、特に在来種の Treber が、其の特異酸酵に主なる役割を演ずる事を知つた。試みに PAWLOWSKI⁽⁶⁾法で兩種の Spelzen 含量を測定して見ると、1 例として大麦に於ては 2.74% (乾物中)、麦芽では 3.56% 程、在来種に多く含まれている。従つて在来種の Treber の量がゴールデン種に比し、多量であり、同量の熱水で浸出される物質も多い事が考えられる。麦芽の糠部 (Leie) 即ち Spelzen 又は Hülse を含む部分と、澱粉質部 (Mehl) の部分を第 2 報記述の如く篩別する。兩種麦芽の Leie 及び Mehl を下の如く種々組合せ、之を準 Kongress 法にて糖化し、酸酵試験を試みた (Tabelle 6)。

Versuch 1. ゴールデン種其のまの割合

2. ゴールデン種の Mehl, Hülse を在来種の其等の割合となせるもの
3. ゴールデン種の Mehl を在来種の其れの割合に、在来種の Hülse を其の割合とせしもの
4. 在来種其のまの割合
5. 在来種の Mehl, Hülse をゴールデン種の其等の割合とせしもの
6. 在来種の Mehl をゴールデン種の其れの割合に、ゴールデン種の Hülse を其の割合とせるもの

その結果、ゴールデン種にありては、Mehl, Hülse の割合を、在来種の組成迄修正しても、在来種の特異性は発現しない。同様に在来種にありては、Mehl, Hülse の割合を、ゴールデン種の組成迄修正しても、其の特異性は匡正されず、兩種の Hülse の単なる量的相違により、在来種の特異性が発現するのでなく、Mehl, Hülse 共、

Tabelle 6.

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	兩種間の本質的な相違を感じしめる。ゴールデン種の Mehl 及び Hülse の割合を変える事なく、Mehl の部分のみを在来種で置換した場合、顕著に特異性を発現し、Hülse も共に在来種で置換する時は、一層著明に之が発現する。在来種の Mehl 及び Hülse の割合を変える事なく Mehl の
Datum Temp.							
6.13.10 ^u Zimm.	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	
	8.4	8.4	8.4	8.9	8.3	8.4	
6.14.17 ^u 7.3°C	(—)	(—)	(—)	(1.2)	(1.0)	(1.0)	
	6.4	6.4	6.4	6.9	6.65	6.8	
6.15.17 ^u 7.6°	(2.5)	(2.5)	(2.5)	(4.7)	(4.9)	(4.0)	
	3.15	3.3	3.4	4.5	4.5	4.4	
6.19.14 ^u 8.7°	(8.4)	(7.8)	(7.8)	(7.5)	(7.5)	7.8	

部分のみをゴールデン種に置換えたもの、又は両者共置換したものは、在来種の特異性は発現しない。以上の事実から在来種の特異性は Spelzen, Mehl 共に其の原因となる如きである。

VI. **在来種原麦 (Gerste) に就て** 前実験迄の酸酵試験の結果から、在来種麦芽中には、其の特異性を発現せしむる因子が存在するであろう事が、ほぼ推測さるゝに至つた。而して在来種麦芽が其の特異性を有するなら

ば、麦芽になる前的大麦にも、特異性の基質となる可きものが、存在する筈である。特異性発現因子が最初から原麦中に存在し、製麦過程に於ては殆ど変化を受けないものであるか、或は最初は原麦中に存在せず、製麦過程に於て初めて生成されて来るものであるかと言う問題が提起される。之が手懸りとして、ゴールデン種麦芽に30%、50%、80%と兩種原麦を混入し、麦汁を調製、之が醗酵試験に現われる影響を観察した。

Bei 30% Mischung mit Gerste,				
Datum	11.24.15 ^u	11.25.10 ^u	11.27.10 ^u	12.1.10 ^u
Temp.	Zimmer	4.0°c	4.0°	4.0
Golden	12.0	6.8 (3.0)	4.8 (11.0)	3.9 (17.0)
Zairai	12.0	6.4 (6.0)	4.7 (14.0)	3.7 (17.5)

Bei 80% Mischung				
Malz	{ Golden 100%	20%	20%	20%
	{ Zairai —	80	—	—
Gerste	{ Golden —	—	80	—
	{ Zairai —	—	—	80
Datum	Temp.			
12. 4.16 ^u	Zimm.	12.0	11.8	11.75
		6.2	5.9	6.7
12. 7.10 ^u	40°C	(12.5)	(23.0)	(5.5)
		4.3	4.5	5.2
12. 9. 9 ^u	4.0°	(20.5)	(28.0)	(15.0)
		3.6	4.1	4.6
12.11.14 ^u	4.0°	(25.0)	(28.0)	(20.0)

Bei 50% Mischung				
Malz	{ Golden 100%	50%	50%	50%
	{ Zairai —	50	—	—
Gerste	{ Golden —	—	50	—
	{ Zairai —	—	—	50
Datum	Temp.			
11.27.11 ^u	Zimm.	12.0	12.0	12.0
11.29.10 ^u	40°	4.5	4.8	5.8
12. 1.10 ^u	"	3.1	3.9	5.0
12. 4.12 ^u	"	2.7	3.7	4.5

ゴールデン種麦芽に、原麦30%混入の場合、兩種原麦間の差は殆ど見られず、原麦50%混入の場合、兩種麦芽間には判然と差異を見せているに拘らず、原麦間には殆ど差異を見せていない。然るに80%混入の場合、兩種原麦間の差異は、麦芽の場合と同様、判然と其の特異性を見せている。之等の事実より、在来種の特異性発現因子はすでに原麦中に存在し、製麦過程で其の程度が強化される如きである。

要 約

1. 在来種麦汁の主醗酵に於て、ゴールデン種に比し酵母の凝集を早期異常に促進せしめ、Bllng. の切れをにぶらしめる特異性は、麦芽の糖化温度 45~60° 所謂 Eiweiss-Rast の期間には、余り大なる関係を有せず、60°以上の糖化温度が関係する。

2. 兩種麦汁共最終煮沸 (Abmaischen) を行われぬ場合、酵母の増殖乃至醗酵は良好にして、在来種にありては著しく其の特異性が消失する。即ち Abmaischen の操作に特異性は大きな関係をもち、特異性発現因子が存在するとせば、80°の如き高温でよく溶出されるものであるか、或はAbmaischenを行われぬ事は、酵素を麦汁中に残存せしめる事であり、酵素が二次的に培地又は酵母に好影響を与えるためかと考えられる。

3. 麦汁煮沸は忽布を添加せずとも、醗酵を阻害する傾向を示すが、在来種の特異性は変化しない。然しながら麦芽粕 (Treber) を除かず煮沸を行ひしものは、明らかに兩種共、特異性を顕著に強化する。即ち Treber を高温で浸出する事が、在来種の特異性の発現に絶大な関係を有し、前項の Abmaischen の操作も、Treber が主役を演ずるも考えられる。特異性発現因子が存在し、Treber を高温で浸出せしめると、よく溶出して来るものであり、煮沸によりても変化せず、又ゴールデン種の其れにも、この傾向を有するところから、在来種特有のものでない事も考えられる。而して在来種中には、ゴールデン種に比し、多量に特異性発現因子が含まれているか、質的に強力なものが存在するのではないかと云う推論に到達した。

4. 兩種麦芽の Hülse の単なる量的相違に原因せず、Mehl 及び Hülse に兩種の本質的相違を感じしめる。即ち在来種の特異性は、Spelzen, Mehl 共に其の原因となる如きである。

5. 在来種の特異性発現因子は、すでに大麦中に存在し、製麦過程 (Mälzerei) に於て、其の程度が強化される如きである。

終りに臨み、終始御指導、御鞭撻を賜りし、東大坂口教授、当社顧問故湯川又夫博士、奥田譲博士に深甚なる謝意を表すと共に、研究の発表の自由を許可せられし当社浅見常務取締役に深謝す。尙実験に協力せられし石丸、中野両君に御礼申上げる。

(1) S. F. HERMSTADT : *Chem. Grund. Kunst. Bier* (1819).

W. WINDISCH : *Brau. Lexik.* (1910).

- A. REINHARD *Wo. f. Brau.*, 1937, 36.
 (2) MOUFANG; *Das Bier*, 1918.
 (3) F. SCHÖNFELD; *J. d. V. L. B.*, 1928, 46.
 (4) A. REINHARD; *loc. cit.* (1)
 (5) 河相; 麒麟麦酒研報 (昭10).
 山口; " " (昭13).
 (6) PAWLOWSKI; *Die Brautech. Unters. Meth.*, 1932.

Zusammenfassung

Fortgesetzt von I. Mitteil. hat der Verfasser ueber die Ursache des abnormalen Gaerbildes bei der Hauptgaerung geforscht, welche fruehzeitig die Flockung der Hefe Foerdert, die vergorene Wuerze klaert, und auch die Gaerung zum Stillstand kommen laesst. Es bekundet sich in den Gaerversuchen, dass das abnormale Gaerbild abhaengig ist, sowie von der Maisch Temp. bei hoecher als 60°C., auch von dem Abmais Verfahren. Besonders, wenn man die Wuerze mit Treber kocht, findet die Bruchbildung der Hefe fruehzeitig stark statt. Aus diesen Versuchen war die Schlussfolgerung zu ziehen, dass es in 6 zeiligen Malz Treber staerkere Bruch verursachende Stoffen als in 2 zeiligen gibt, welche in heissem Wasser loeslich sind.

微生物のクエン酸分解に関する研究 (第2報)

Bact. succinicum の乾燥標本の有機酸代謝

高 橋 甫 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和27年7月26日受理

Studies on the Decomposition of Citrate by Microorganisms. Part 2. On the Acid Metabolism by the Dried Cell Preparation of *Bact. succinicum*.

By Hajime TAKAHASHI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

前報¹⁾において筆者等は *Bact. succinicum* の生菌を用い、醋酸酸化におよぼすパントテン酸 (PaA) 同化の影響、醋酸の完全酸化、醋酸酸化のマロン酸阻害とそのフマル酸添加による回復等から、醋酸はクエン酸を経てトリカルボン酸サイクル (TCA-サイクル) により酸化分解されることを証明した。

またクエン酸の嫌氣的分解反応が α, α' -デピリジルによりいちぢるしく阻害されるのに反し、クエン酸の酸化分解はデピリジルにより全く阻害されないことを示し、嫌氣的条件下でのクエン酸の分解は坂口教授、多田氏^(2,3)の想定した $C_6 \rightarrow C_4 + C_2$ の反応を伴うことを認めた。

しかし通常のクエン酸-ブイオン培地に生育した菌体が $Q_{CO_2} = 20$ 前後の嫌氣的クエン酸分解能を示すにもかかわらず、醋酸酸化能のある PaA-rich cell が嫌氣的クエン酸分解力を欠くことから、クエン酸の直接的な C_4 酸と C_2 酸への分解は LIPMANN 等⁽⁴⁾或いは OCHOA 等⁽⁵⁾のクエン酸合成酵素 "Condensing enzyme" とは別の酵素により接触されるか、或いは別の co-factor を更に必要とするものと想像した。

本報においては *Bact. succinicum* の乾燥標本を用い、この有機酸代謝を追求し、本菌の TCA-サイクル、デピリジル等2,3の毒物の阻害部位等について検討を加えたのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 醋酸酸化能をもつ乾燥標本と、もたない乾燥標本の調製 a) 醋酸酸化能をもつ乾燥標本: 肉エキス、ペプトン各1%, クエン酸ソーダ1%, 食塩 0.5% の培養液を pH=7.0 に補正し、菌を接種後 30, 24時間振盪培養する。培養終了後 (pH=9.0 以上) 稀 HCl で中和し、遠心分離、水洗した後、菌体を塩化カルシウム上に減圧乾燥、保存する。

このように調製した乾燥標本は作成時クエン酸に対し $Q_{O_2} = 40$, 醋酸に対し $Q_{O_2} = 30$ 程度の酸化能を示し、