酒精製造に於ける乳酸菌, 酵母及びアミロ菌 等の関係について (第1報)*

分離乳酸菌に及ぼす酵母, アミロ菌の影響

根 元 茂, 入 江 淑 郎 (合同酒精株式会社)

昭和 33 年 3 月 3 日 受 理

緒 言

乳酸菌の細菌学的特性については各方面より詳細に研究されているが, 他の菌との相関関係についても, 最近種々の角度より研究されつつある. 即ち Challinor & Rose⁽¹⁾ 氏は酵母と乳酸菌との密接な関係につき報告し, 伊藤, 松木, 植村^(2,3) の諸氏は清酒酵母は清酒乳酸菌の要求する生長因子を分泌する事を報告している. 著者の一人根元⁽⁴⁾はブタノール菌に対する乳酸菌の阻害作用につき報告した.

著者等は酒精醱酵に及ぼす乳酸菌の影響を知るために各種の実験を行った. 即ち酒精醱酵より数種の乳酸菌を分離し, これ等を酒精酵母, アミロ菌及び或る種の微生物と組合せて混合培養し, 2, 3 の知見を得たので, その結果につき報告する.

実 験 の 部

I. 乳酸菌の分離 工場に於て停電事故のため, 数本の醱酵槽で醱の終末酸度が連続的に上昇した. いずれの醱酵槽に於ても乳酸菌は酵母移植後約 24 時間後に出現し, 酸度上昇は酵母湧付後開始した. 乳酸菌が混入したと思われる停電時に於ては, 各醱の状態が異っているにも拘らず, これ等の醱は殆んど同一の経過を辿った. 即ち乳酸菌の混入が直ちに酸の上昇を意味するのでなく, 酒精醱酵の経過に伴って乳酸菌の発育環境が助成されるのでないかと思われせるので, 本実験を開始した.

先ず主因となる乳酸菌の分離を行った. 麴汁石灰平板培養法により常法に準じて行った. 培養基の組成は麴汁ボーム 9.0, 炭酸カルシウム 0.5%, 寒天 2% である. 分離した 4 株の菌の培養状況は次の如くである.

(1) 固形培地: 固形培地に於ける繁殖状況並びに菌の形態を第 1 表に表わす.

(2) 液体培地:

イ) 中性の麴汁培養基に接種し, 30° の恒温器にて 6 日間培養し, 培養液 10 cc につき N/10 NaOH にて, メ

チール・レッド及びチモール・ブルーの混合指示薬を用いて滴定し, 生酸の程度を, 又培養基の混濁により乳酸菌の繁殖程度を観察した. この結果を第 2 表に表わす.

第 1 表 固形培地に於ける分離乳酸菌の繁殖状況

菌株	培養基 培養法	麴 汁 寒 天		グルコース ブイヨン寒天	
		斜面培養	穿刺培養	斜面培養	穿刺培養
L-1		++	++	++	++
29-1		+	++	±	+
L-2		—	—	±	+
L-3		++	++	++	++

ロ) pH 7.0 に調

第 2 表 麴汁培養に於ける分離乳酸菌の繁殖状況

菌株	日 数	2 日		3 日		4 日		5 日		6 日	
		繁殖度	酸度	繁殖度	酸度	繁殖度	酸度	繁殖度	酸度	繁殖度	酸度
L-1		+++	3.5	+++	4.0	+++	4.5	+++	4.5	+++	6.0
29-1		++	1.0	++	2.0	++	2.0	++	2.0	++	3.0
L-2		++	1.0	++	3.0	++	3.0	++	3.0	++	3.0
L-3		+++	6.0	+++	10.0	+++	12.5	+++	12.5	+++	12.5

この結果によれば酒精醱酵を汚染する乳酸菌には北原⁽⁵⁾氏の指摘された如く, 桿菌及び球菌があり, 又桿菌, 球菌共に菌

* Studies on the Relations between Yeasts, *Rhizopus* and *Lactobacilli* in Alcohol Producing Process. Part I. The Influence of Yeasts and *Rhizopus* on the Isolated *Lactobacilli*.
By Shigeru NEMOTO and Yoshio IRIE (Godo-Shusei Inc.)

株の差により生酸に強弱のある事が判明した。然しこれは培養基の組成、培養条件等によってかなりの影響を受けるものと思われる。更に液体培地に於て麴汁を使用せる時は 29-1 号菌及び L-2 号菌は発育、生酸共に劣っていたが、グルコース・ブイヨンでは何れの菌も旺盛な発育並びに生酸を示した。

II. 乳酸菌の生酸について

(1) 蒸煮醪による生酸試験について：分離せる乳酸菌によって実際工場に於ける如く、酸度の上昇が再現し得るや否やを検討するため、乳酸菌、アミロ菌、酵母を組合せて下記の試験を行った。

試験方法 イ) 使用乳酸菌 29-1 号菌。ロ) 醪の組成：甘藷澱粉粕 1600 貫、二番粉 600 貫、玉蜀黍 500 貫、小麦粉 500 貫を 550 石の醱酵槽に仕込みを行った工場の醪の一部を使用した。ハ) 上記の醪を 300cc のフラスコに 200cc ずつ分注し、試験に供した。ニ) 乳酸菌とアミロ菌及び酵母を組合せて培養し、2, 4, 6 日目に培養基 10cc をとり N/10 NaOH にて滴定した。ホ) アミロ菌を使用せる場合には 1 日目に乳酸菌のみか、又は乳酸菌及び酵母を夫々 1 白金耳ずつ接種した。

第 3 表 蒸煮醪に於ける混合培養試験

菌株	培養条件	酸 度 cc			
		1 日	2 日	3 日	4 日
29-1	乳酸菌単独	1.0	1.5	1.5	1.5
	アミロ菌+乳酸菌	1.0	1.5	3.5	4.5
	アミロ菌+乳酸菌+酵母*	1.0	1.5	5.0	7.0
L-1	乳酸菌単独	1.0	2.5	1.0	1.0
	アミロ菌+乳酸菌	1.0	2.5	3.5	3.5
	アミロ菌+乳酸菌+酵母*	1.0	1.0	4.5	6.5
	アミロ菌単独	0.5	0.5	1.0	1.5

* アミロ菌、乳酸菌は同時に接種し、酵母は其後 2 日目に接種した。

この結果を第 3 表に示す。これによれば蒸煮醪に乳酸菌のみを添加したものは生酸しない。これは乳酸菌が澱粉分解能、蛋白分解能を有しない事より当然な事と思われる。然し、アミロ菌にて糖化した醪を使用したものにも 4.5cc 程度で充分な生酸とは言いがたい。これに酵母菌を添加すれば、生酸度は上昇する。即ち乳酸菌の生酸はアミロ菌による糖化のみにては不充分にて、

酵母の存在する事により促進される如くに思われる。

(2) 麴エキスの混合培養：次に分離せる乳酸菌の桿菌及び球菌を夫々一種宛使用し、pH 7.0 に調節せる麴汁を培養基として酵母の添加時期を種々変更して各種の組合せを作り、培養せる状況について観察した。尚該乳酸菌の場合はブイヨンの方が麴汁よりも発育し易いため、これにブイヨン並びにアミロ菌による糖化醪を添加した試験も行った。この結果を第 4 表に記載した。本実験の結果によれば、29-1 号菌及び L-1 号 (球菌)

第 4 表 麴エキスの混合培養

菌株	培養条件	酸 度 cc					
		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
29-1 (桿菌)	乳 酸 菌	0.5	+酵 母 3.25	6.25	7.0	8.75	8.75
	乳酸菌+酵母	0.75	3.75	4.0	4.25	4.25	4.5
	酵 母	+乳酸菌 0.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	酵 母	0.5	+乳酸菌 1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	乳酸菌単独	0.5	3.0	5.5	7.0	7.0	8.0
	乳 酸 菌	0.5	3.25	+ブイヨン20cc 5.75	6.75	7.75	8.25
	乳 酸 菌	0.5	3.0	+糖化醪10cc 6.75	9.50	9.5	10.0
L-1 (球菌)	乳 酸 菌	1.25	+酵 母 3.5	3.75	4.75	6.5	7.5
	乳酸菌+酵母	1.25	4.25	4.5	4.75	5.5	5.5
	酵 母	+乳酸菌 0.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	酵 母	0.5	+乳酸菌 1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	乳酸菌単独	1.25	3.5	4.0	4.5	5.5	5.5
	乳 酸 菌	1.5	3.5	+ブイヨン20cc 4.25	4.5	5.5	5.75
	乳 酸 菌	1.25	3.25	+糖化醪10cc 4.25	5.0	5.25	5.75
	酵 母 単 独	0.5	1.25	1.5	1.5	1.5	1.5

備考：乳酸菌及び酵母ともに接種量は 1 白金耳

共に酵母と混合培養せる場合、酵母が概ね繁殖を終了せる後に乳酸菌を添加しても殆んど発育及び生酸を示さないが乳酸菌と同時に若しくは後に酵母を接種した時は著しく酵母の発育は阻害され、乳酸菌は単独の場合と略同様若しくはそれ以上生酸する。又ブイヨンを添加した場合、本実験で添加した程度の量では乳酸菌の発育には殆んど影響を与えないが、アミロ菌による糖化醪を添加した場合には 29-1 号菌のみ稍生酸を促進する事が認められた。然し麴汁を使用せる場合は、乳酸菌単独にても相当の生酸を行うので、酵母、アミロ菌の影響は顕著に表われないので、次の試験を行った。

(3) ヘンネベルヒ培養液に

第 5 表 ヘンネベルヒ培養液による混合培養

菌株	培養条件	酸 度 cc					
		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日
29-1 (桿菌)	乳 酸 菌	+	0.5	2.5	5.0	8.5	10.0
	乳酸菌+酵母	0.5	7.5	9.0	9.0	10.0	10.0
	酵 母	+	2.5	3.0	4.0	5.0	5.0
	酵 母	1.5	1.5	1.5	3.5	5.0	5.0
	乳酸菌単独	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	乳 酸 菌	1.0	1.0	+	2.0	4.5	7.5
	乳 酸 菌	1.0	1.0	+	2.0	2.0	2.0
	乳 酸 菌	1.0	1.0	+	2.0	2.0	2.0
L-1 (球菌)	乳 酸 菌	+	4.0	5.5	7.0	9.5	10.0
	乳酸菌+酵母	3.0	5.5	8.0	8.5	10.0	10.0
	酵 母	+	2.5	3.0	3.5	4.5	4.5
	酵 母	2.0	2.5	2.5	2.5	4.5	4.5
	乳酸菌単独	2.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	乳 酸 菌	3.0	4.5	+	5.0	8.5	10.0
	乳 酸 菌	3.0	4.5	+	5.0	5.0	5.0
	酵 母 単 独	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

よる試験： 麹汁の如き天然培養基を使用する場合、乳酸菌の発育及び生酸にはその調製条件により区々の結果を生ずるので、これを避けるため人工培養基を使用して実験を行つた。即ちヘンネベルヒ培養基（グルコース 5 g, ペプトン 1 g, アスパラギン 0.3 g, 磷酸加里 0.3 g, 硫酸苦土 0.01 g, 蒸溜水 100 cc, pH 7.0）を使用して前実験に準じて試験を行ったが、その結果を第 5 表に示す。本実験の結果興味ある現象はヘンネベルヒ培養基を使用した場合には 29-1 号菌単独にては殆んど発育しない。これに糖化醗を添加しても効果はないが、同じヘンネベルヒ培養基のみでも、酵母を共存させた場合には発育を始める。特に酵母を乳酸菌の後に接種せ

るものは発育並びに生酸共に頗る良好であった。これは酵母の増殖過程に於てヘンネベルヒ培養基より生産される物質が、乳酸菌の発育及び生酸を促進するのではないかと思考される。又乳酸菌単独にてもグルコース・ブイオンを添加せる場合には同様に乳酸菌の発育、生酸は促進される。この事実は工場に於て酵母の増殖期に乳酸菌が発育し、生酸する事実とよく符号する。

(4) ヘンネベルヒ変形培地による試験：

(i) ヘンネベルヒ培養液のペプトン及びアスパラギンの代りに、硫酸 2% 及び炭酸石灰 1.6% を添加して培養基を調製し、前実験と同様な試験を行った。即ち窒素源を全く無機塩で置換したのである。当初乳酸菌及び酵母を一白金耳宛植菌したが、何れも繁殖が認められなかったので、アミロ菌の孢子懸濁液を約 3cc 接種してみたが、遂に繁殖が認められなかった。よってこの培養基につき次の試験を行った。

第 6 表 ヘンネベルヒ変形培地による試験

培 養 基	実 験 区 分	培 養 日 数									
		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	1 日	2 日	3 日	4 日
		アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育	アミロ菌の発育
A	1	+	+	29-1 菌接種	2.25	+	2.5	+	2.5	+	3.0
	2	+	+	L-1 菌接種	2.25	+	2.75	+	2.5	+	3.5
B	3	—	—	+	—	29-1 菌接種	0.5	+	1.0	+	4.0
	4	—	—	+	—	L-1 菌接種	0.5	+	1.5	+	3.5

イ) 酵母を稍多く、即ち 10 cc 程度の懸濁液を植えたが、この場合は乳酸菌は発育して来た。

ロ) アミロ菌の孢子を接種する際、アミロ菌の繁殖した馬鈴薯の薄片を 1 箇添加したが、アミロ菌も発育して来た。然し乍ら当初接種せる乳酸菌は発育して来なかった。而してアミロ菌の繁殖後 29-1 号菌を接種すると、乳酸菌の繁殖は見られた。以上の結果を検討して見るに無機塩を窒素源とした本培養基に於ては、乳酸菌、酵母及びアミロ菌の何れも発育出来ないが、アミロ菌、酵母の存在に於ては発育する事が認められた。

(ii) 上記の実験に於て炭素源の種類及び添加せる硫安の量を減少せしめた際、乳酸菌と酵母は如何なる相関関係を示すかを観察するため、次の如き培養基の組成で前実験に準じて試験を行った。

A培地：グルコース 5g, 燐酸-加里 0.5g, 硫安 0.3g, 硫酸苦土 0.01g, 蒸溜水 100 cc.

B培地：澱粉 5g, 燐酸-加里 0.3g, 硫安 2g, 硫酸苦土 0.01g, 炭酸カルシウム 1.6g, 蒸溜水 100 cc.

A培地は実験農芸化学上巻 236 頁所載のリゾプス属を使用して乳酸醱酵及びフマル酸及びフマル酸醱酵を行わしめる場合の培養基に於ける硫安濃度と同じにした。

B培地は前実験に於ては炭素源がグルコースであったが、これを澱粉とした。その結果を第 6 表に示す。この結果が示す如く、炭素源をグルコースとし、且硫安濃度を低下させたA培地は炭素源を澱粉とし、且硫安濃度の高いB培地よりもアミロ菌の生育は速やかであった。然しB培地の場合でも前実験と異り、アミロ菌の生育を示した。アミロ菌が発育した後、乳酸菌を接種したが乳酸菌 29-1 号菌、L-1 菌共に発育して来て生酸したが、3.0～4.0 cc 程度で充分な生酸とはいえない。これは第 3 表の蒸煮醪に於て観察された事実とよく符号する。

III. 固体培養基に於ける共生現象

(1) 平面培養：乳酸菌を平面培養により純粋分離を行う時、その菌株によりコロニーは非常に小さい。然しこれに酵母菌を添加して平面培養を行うと酵母菌の大きいコロニーの周辺に乳酸菌 29-1 号菌のコロニーが良く発育している。乳酸菌は平面培養せるシャーレの全面に散布されているはずであるが、酵母のコロニーの周辺にあるもののみがよく発育して周辺の石灰を溶解している。この状況を写真 1 に示す。

(2) 劃線培養：写真 2 は上述の実験を更に確認する為に白亜麴汁寒天培養基にて乳酸菌を培養し、更に酵母の十字の劃線培養を行ったものである。中央の交叉せる大きい酵母菌のコロニーの周辺に沿って、白色の乳酸菌のコロニーが多数よく発育している。

(3) 純粋分離に於ける応用：麴汁白亜寒天に少量の酵母を培養せる麴汁の上澄液を加えて、培養すれば前述の如く比較的大きい乳酸菌のコロニーが出現する。

即ち通常の麴汁寒天では発育不良で、分離困難な乳酸菌の分離に際して、酵母の培養液を添加して平板培養を行えば容易に分離し得る。

(4) 細菌と乳酸菌の場合：乳酸菌特に本実験に使用せる 29-1 号菌は麴汁白亜寒天で平板培養を行った際、コロニーの発現せぬ事が時に見受けられた。この一見無菌に見える平板培養の切片をグルコース・ブイヨンに接種すると乳酸菌が発育して来ることがある。このような一見発育を示さぬ平板培養のシャーレの蓋をとり、空气中に曝し、再び蓋をして培養すると空气中より混入したと思われる雑菌のコロニーの内部若し

写真 1

写真 2

写真 3

くはその周辺に比較的大きい乳酸菌のコロニーが出現する。この状況を写真 3 に示す。即ち空气中より由来する好気性菌と思われる或る種の細菌も乳酸菌の発育を促進する如くに考えられる。

IV. 乳酸菌 29-1 号菌の諸性質

(1) 形態学的性質

栄養細胞；桿菌 $0.4 \sim 0.5 \mu \times 1.5 \sim 2.5 \mu$, 単独又は連鎖, 時に長連鎖をなす。染色性；グラム陽性, 運動性；なし。

(2) 培養基的性質

麹汁寒天培養；繁殖困難, 表面及び内面に極めて小なるコロニー所謂ピン・ベッド・コロニーを生ず。白色コロニーは円形乃至不正円形又は半レンズ形。

グルコース・ブイヨン；初め絹糸状濁濁を生じ, 1 週間後の培養に於て菌体は沈下し清澄となる。

(3) 生理的性質

カタラーゼ反応；陰性。硝酸塩還元性；陽性。ガス発生；殆んどなし。酒精生産；殆んど副生せず。揮発酸；殆んど副生せず。インドール；陰性。繁殖の適温； 37° 。死滅温度； 60° , 5 分。

炭水化物よりの生酸性；グルコース, ガラクトース, シュクロース, 乳糖より生酸す。アラビノース, キシロース, グリセリン, マルトース, ラフィノース, デキストリン, イヌリン, 澱粉, マンニット, ソルビット, ラムノース, グリコーゲンより生酸せず。

VII. 乳酸菌 L-1 号菌の諸性質

(1) 形態学的性質

栄養細胞；連鎖状球菌, 経 $0.8 \sim 0.9 \mu$, 長連鎖多し。染色性；グラム陽性。運動性；なし。

(2) 培養基的性質

麹汁寒天培養；良好な繁殖を示す。表面及び内部に 29-1 号菌より稍大なるコロニーを生じ, 乳白色隆起せる小顆粒を示す。半レンズ形乃至楕円不正円形である。

グルコース・ブイヨン；初め絹糸状濁濁を生じ, 1 週間後の培養にて菌体は沈下し, 清澄となる。

(3) 生理的性質

カタラーゼ反応；陰性。酒精揮発酸の生成；酒精及び揮発酸を副生す。炭水化物よりの生酸性；アラビノース, キシロース, グルコース, ガラクトース, シュクロース, マルトース, ラフィノース, デキストリン, 乳糖より生酸し, グリセリン, イヌリン, 澱粉, マンニット, ソルビット, ラムノース, グリコーゲンより生酸せず。

総 括

アミロ法による酒精醗酵に於ける乳酸菌の汚染機構を解明するため, 乳酸菌とアミロ菌及び酵母等の関係を検討せる結果を総括すれば次の如くである。

(1) 蒸煮醪の如き澱粉質原料を使用した場合, アミロ菌による糖化のみでは不十分しか生酸し得ないが, 酵母の存在により, 生酸は促進される。

(2) グルコースを主体としたヘンネベルヒ培養基に於ては乳酸菌単独では繁殖し得なくとも, アミロ菌が繁殖すれば繁殖し, 酵母の増殖後は充分生酸する。

(3) 固形培養基に於てもこの事実はよく立証し得た。

終りに臨み, 終始御懇篤な御指導を賜った東京大学農学部坂口謹一郎教授, 有馬啓助教授, 応用微生物研究所池田庸之助教授, 名古屋大学農学部土井新次教授に深甚なる謝意を表すると共に終始御支援御鞭達を与えられた合同酒精株式会社社会長堀末治氏, 社長野口喜一郎氏, 常務取締役高野賢次氏, 清水工場長堀豪三氏に対し深謝申し上げます。

(1) S. W. Challinor, A. H. Rose : *Nature*, 174, 877 (1952).

(2) 伊藤雄太郎, 松木 翠, 植村定治郎 : 本誌, 31, 779 (1957).

(3) 伊藤雄太郎, 松木 翠, 植村定治郎 : 本誌, 31, 783 (1957).

(4) 根元 茂 : 本誌, 32, 287, 530 (1958).

(5) 北原覚雄 : 本誌, 16, 697 (1940).