(2) グルコース存在下では、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸が稍促進的に作用し、その他の TCA Cycle に関与する有機酸はグルコースが比較的多く存在する場合は殆ど影響を示さないが、グルコースの少ない場合には若干促進効果が認められた。尚以上の促進効果は何れもグルコースの存在を必要とし、グルコースが共存しない場合には炭素源物質無添加と大差がなかった。

(3) 蟻酸、酢酸、酪酸等の低脂肪酸は $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収を著しく阻害し、酢酸を除いては炭素数の増大と共にこの傾向が強い事を認めた。

(4) 又菌体内可溶性窒素及びアミノ態窒素の増加に対しては、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収に大体比例して増加して居り、低級脂肪酸の添加により著しく阻害される事が認められた。

(5) 酢酸、蟻酸等の阻害現象は細胞内可溶性窒素から蛋白質の生成する過程に於ても認められた。

本実験を行うに当り振盪機の使用その他の便宜を与えられ、且つ種々御教示戴いた東北大学教授植村定治郎先生はじめ同研究室の各位に衷心より感謝の意を表します。

(1) 間瀬泰男 : 醸工, 32, 272 (1954).

(4) 菅原 潔, 熊谷和夫, 志村憲助 : 本誌, 32, 348 (1958).

(2) E. F. Gale : *J. Gen. Microbiol.*, 1, 53 (1947).

(5) F. Lynen : *Liebig. Ann.*, 539, 1 (1939).

(3) 照井堯造, 岡田弘輔 : 大阪醸造学会 30 周年記念特集, 醱酵工業の展望 (醸工, 30, No. 10) 56 (1952).

(6) H. A. Krebs, S. Gurin, L. V. Eggleston : *Biochem. J.*, 51, 614 (1952).

生醱系酒母のアミノ酸の生因について (第 1 報)*

酒母中の窒素成分の抽出条件の検討

秋 山 裕 一 (国税庁醸造試験所)

昭和 32 年 9 月 12 日 受 理

生醱系酒母のアミノ窒素 (窒素を N と略記する) が速醱系よりも 2~3 倍多くなる原因についての従來說⁽¹⁾に対して蔭山、杉田の米麴プロテアーゼと乳酸菌ペプチダーゼ共同作用説⁽²⁾が提出されたが、筆者は前報⁽³⁾に於て抗生物質等を用いて各種のモデル酒母をつくりアミノ酸の生成を検討した結果、米麴のみによってアミノ酸量を生醱に近くする事が出来る事を報じた。これには生醱系酒母の初期段階即ち打瀬から暖気初期の中性期間の存否に重要な意義があるのではないかと考えた。生醱系酒母 (実際に実験室的仕込では生醱は仕込めないのも山麴醱で行う) は成書⁽⁴⁾にもある如く製造中に大きな pH の変動があるが、速醱系は最初から酸性で製造全期間中 pH の大きな変動はない。従って酒母の物理化学的状态は生醱に於て大きな変動があるので、その N 物の変化の検討に当っては蛋白質の性状の多様性に鑑みて、その抽出法を検討しなければならない事を指摘し、その一例として山麴醱の初期には水では抽出されないが、乳酸にて抽出される多量の高分子 N 物が生成されており、しかも乳酸濃度によって溶出 N 組成に相違が見られる。これに対して速醱系では抽出法による差があまり見出せなかった事を報じた。そこで本報では酒母中の N 成分の抽出条件について検討した。又抽出 N 物の定量法を Folin のフェノール試薬による比色法⁽⁴⁾により検討し、乾⁽⁵⁾の報告の如く十分利用出来る結果を得たので N の定量を本法により簡易化する事が出来た。

実 験 の 部

実験方法 : 酒母の仕込配合 前報と全く同様、5, 2, 6 の基本配合により、山麴酒母を仕込み、約 5° の冷蔵庫或は他の温度に保ち分析に供した。

分析方法及び表示 : 酒母の N 物の抽出方法及びその区分法については前報同様蔭山の方法に準じて行い、N 定量法については後記する如く主として Folin 法により日立 EPO-B 型光電比色計 (10 mm セル) 660 m μ にて比色定量を行った。pH はガラス電極 pH メーターによった。

* The Formation of Amino Acids in Ki-Moto. Part I. On the Extraction of Nitrogenous Compounds in Moto Mash.

By Hiroichi AKIYAMA (Brewing Experimental Station, Tax Administration Agency)

分析値のN量の表示はすべて酒母 100 g 中の N mg 数により、N物の各区分の略号は前報同様でS-N, TCA-N, PTA-N, F-N を用いた。

実験及び結果

(1) 抽出Nの定量に対して Folin 法の応用 乾⁽⁶⁾は先に合成清酒香味液の全Nの定量に本法を応用し、ケルダール法によるN量に対比するに相関係数 0.952 なる結果を得て、香味液中のNの定量に本法が使用し得る事を報告した。筆者も同法を種々の酒母抽出液に応用し、ケルダール法によるN量と対比するに第1表の如く相関係数 0.944 なる値を得て、本法がケルダール法の代りに用い得る事を認めた。これを第1図に図示する。更に TCA 可溶性 N 及び PTA-N についてもケルダールNと対比するに第1図の直線が利用し得る事が知られたので、以後 S-N, TCA-N (S-N - TCA 可溶性N), PTA-N すべてに対して Folin 法による比色法を用いる事とし、ケルダール法による繁雑さを省く事が出来た。

(2) フェノール試薬の発色に対する各種試薬の影響 酒母のN物の抽出条件を検討するに当って、各種の酸類及び相当高濃度の無機塩類を用いるが、これ等がフェノール試薬の発色に影響すると上記のグラフが用いられ

第1表 ケルダール法及び Folin 法による窒素の定量

I 可溶性 N (S-N)		II トリクロル酢酸可溶性N		III 燐タングステン酸可溶性N (PTA-N)	
ケルダール法 N mg/g	Folin 法 O. D. 660 m μ	ケルダール法 N mg	Folin 法 O. D.	ケルダール法 N mg	Folin 法 O. D.
0.67	.117	2.40	.256	1.47	.175
1.34	.164	2.40	.250	1.60	.139
1.62	.205	2.50	.301	1.99	.219
1.78	.160	2.55	.295	2.03	.245
1.82	.186	2.80	.311	2.38	.258
2.02	.227	2.98	.301	2.80	.281
2.24	.233	3.43	.321		
2.57	.280				
2.69	.285				
2.94	.330				
3.36	.372				
3.81	.435				
4.27	.436				
平均					
2.39	.264				
標準偏差					
9.89	.107				
相関係数					
$\gamma = \frac{\sum D_x \cdot D_y}{n \sigma_x \cdot \sigma_y} = 0.944$					

Folin 法による発色値は酒母抽出液について I は 0.1 ml, II 及び III は夫々処理した濾液について 0.2, 0.5 又は 1 ml を発色せしめる。ケルダールNは抽出液或は処理濾液について測定し、これを表示に便なるように I は酒母 1g のN量に、II 及び III は発色に用いた液量より換算して対比表示した。

ないので各種試薬について第2表の如き濃度及び量に於てその影響を検した。NaCl は影響ない。MgSO₄, Ca(H₂PO₄)₂, CaCl₂, KCl は発色液に沈澱を生じ、吸光密度(O. D.) はやや低く出るが、前三者は使用し得る。しかし KCl は少量でも沈澱を生じ発色が阻害され抽出剤として用いても本法は使用し得ない。酸類は普通酵素作用の緩衝液に使用されている故試験を行わなかった。

(3) 抽出温度及び時間 0.5 及び 0.1% 乳酸液にて 30°, 15°, 5° に於て各時間抽出し、S-N と TCA-N とを測定した。第3表に見る如く S-N は各温度間及び時間では大した差は見られないが、TCA-N は高温で明かに少くなり、又時間とともに減少する

第2表 各種無機塩類のフェノール試薬の発色阻害試験

塩 類	添加量 ml	O. D.	塩 類	添加量 ml	O. D.
0.2% NaOH	0.5	.268	10% NaCl	0.5	.243
	0.2	.250	10% CaCl ₂	0.5*	.228
	0.1	.250	10% アルコール	0.5	.235
5% MgSO ₄	0.5*	.233	10% KCl	0.5*	測定不能
1% KHPO ₄	0.5	.238		0.2*	.182
1% Ca(H ₂ PO ₄) ₂	0.5*	.218		0.1*	.197
	0.1	.247	対 照		.247

酒母抽出液 0.1 ml に塩類溶液を加え水にて全量を 1 cc として発色させる。
* は発色液が沈澱を生じ、その濾液についての値。

第1図 ケルダールNと Folin 法吸光密度との関係

第 3 表 抽出温度及び時間の比較

抽出温度 ℃	抽出時間 時間	水		0.1% 乳酸		0.5% 乳酸	
		S-N mg/100g	PTA-N mg/100g	S-N mg/100g	TCA-N mg/100g	S-N mg/100g	TCA-N mg/100g
30	0	131	147	227	64	271	63
	0.5	133	153	243	51	292	54
	1	138	161.5	257	30	290	33
	2	141		260	27	292	(11)
15	0			271	27		
	0.5			243	29	290	65
	1			247	15	286	39
	2			276	33	286	(13)
5	0	131	128	249	97	283	113
	1	140	128	251	50	290	77
	2	143	128	257	24	285	62
	3	150	127	265	38	290	62

第 4 表 抽出条件の検討

分析値はすべて酒母 100 g 中の N mg.

I. 酸類及びアルカリ類による抽出

抽出剤品名	濃度	pH	S-N TCA-N PTA-N		
			mg	mg	mg
水		6.62	57	0	55.2
酸	乳 酸	0.1 N	3.01	183	86.5
		0.05	3.14	177	64.5
		0.04	3.23	162	54.0
		0.03	3.46	161	40.0
		0.02	3.52	141	0
		0.01	3.90	120	0
類	琥珀 酸	0.1 N	3.06	174	59
		0.02	3.61	148	0
	酢 酸	0.1 N	3.57	105	0
		0.02	4.08	92	0
	クエン 酸	0.15 N	2.42	189	71.0
		0.075	2.70	183	64.5
類	硫 酸	0.05	2.90	155	25.0
		0.01 N	2.95	130	0
	塩 酸	0.01 N	2.77	172	47.5
		0.005	3.52	166	0
	アルカリ類	0.2%	11.42	155	95.8
		0.1	10.93	101	40.6
類	カセイソーダ	0.05	10.61	74	15.6
		0.1 N	10.40	75	24.5
	炭酸ソーダ	0.05	10.19	86	40.8
		0.025	10.11	80	27.6
		0.01	9.95	71	26.5
					39.8

II. 緩衝液による抽出

種 類	濃度	pH	S-N mg	TCA-N mg	PTA-N mg
McIlvaine 緩衝液	pH 3.2	3.60	145	27.0	66.0
	4.0	4.41	105	0	64.5
	5.0	5.42	88.5	0	60.8
	6.0	6.26	77.5	0	50.8
M/10 クエン酸- M/5 磷酸ソーダ	7.0	7.30	56	0	50.4
	8.0	8.21	52	0	50.4
乳酸緩衝液	pH 2.5	2.82	171	67.5	48.0
	3.0	3.08	172	53.2	51.5
	3.5	3.66	166	51.2	50.0
	4.0	4.10	117	35.0	47.6
N/10 乳酸- 乳酸ソーダ	4.5	4.51	88.5	29.7	42.8
	5.0	4.81	82.0	(+)	50.0
酢酸緩衝液	pH 3.5	3.61	157	49.0	51.6
	4.0	3.93	123	27.0	50.7
	5.0	4.91	103	0	55.2
	pH 2.0	2.02	147	85.0	36.8

のは、やはりこの短時間にも消化分解される事を示している。従って出来る丈低温で行うのが望ましいのであるが、一応抽出条件は 15°, 1 時間とした。0.1 及び 0.5% 乳酸抽出の TCA-N の変化について比較すると、0.1% では一旦は減少するが消失しない。然るに 0.5% では次第に減少し、この場合では 15°, 2 時間で殆んど消失した。これは酒母中の N 物の消化様式に関連して興味ある事実である。ここに用いた酒母は室温 (25°) に 5 日間保ったもので、次項に用いる酒母とは違う試料である。

(4) 抽出剤の比較 仕込後 5° に保ち、10 日後の酒母を分析に供した。抽出液は第 4 表に示した如き各種の酸類を主とし、緩衝液、無機塩類、アルカリ類及びアルコールを用いた。前報で山廃酒母の初期に水には溶けないが乳酸では溶出する相当高分子の N 区分があり、その抽出 N 組成は酸の濃度によって異なる事を示したが、この現象は酸根の作用によるか、pH によるかであると考えられるから各種の酸類及び緩衝液を用いた。又水抽出の全 N よりも乳酸抽出液中の低分子 N 物である PTA-N の方がやや多い結果を得た (前報)。これは酒母の如き濃厚状態のもろみでは吸着現象があるって水では溶出されないのではないかとも考えられるので、蛋白質の溶出剤に用いられる 10% 食塩、0.2% アルカリ液、その他普通の無機塩類を用いた。

実験結果は第 4 表に示す如く山廃酒母中の水不溶性の N 物は酸類にはいずれも可溶で、大体同じ pH では溶出 N 量に大差が見られない。前報でも指摘した如く、この酒母では pH 3.5 を境として抽出 N 物の組成特に

III. 無機塩類による抽出

種 類	濃度	pH	S-N mg	TCA-N mg	PTA-N mg
塩	NaCl	10%	68	5.2	46.0
		1	64	0	53.2
	MgSO ₄	5	5.02	88	+
		0.5	5.92	74	0
類	KH ₂ PO ₄	1.0	5.73	69	0
		0.1	6.04	60	0
	K ₂ HPO ₄	1.0	8.00	59	0
		0.1	7.82	61	0
類	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.0	4.90	179	0
		0.2	5.34	69	0
	Ethyl alcohol	10%	44	0	47.2
		5	55	0	47.2
類		2.5	52	0	54.0

TCA-N が異り、pH が高くなると S-N も次第に小となるが、水抽出よりは多く、TCA-N が見出されなくなる。PTA-N の如き低分子 N 物は水抽出のものと殆んど差がない。この事実は酸によって分子量の大きい N 物が溶出されて来ている事を示すものである。

緩衝液抽出によっても大体上記と同様の傾向が認められるが、乳酸緩衝液では pH 4 以上でもなお TCA-N が見られる事はクエン酸及び酢酸緩衝液ではない現象で、これは乳酸の性質（高分子 N 物の溶解性の高い事）を示すものではなからうか。中性附近の pH では水抽出と同様な結果を得た。

無機塩類及びアルカリ類については蛋白質の抽出剤及び吸着 N 物の溶離という観点から相当高濃度のものを用い、中性塩 (NaCl , MgSO_4)、塩基性塩 (K_2HPO_4)、酸性塩 (KH_2PO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$)、 NaOH , Na_2CO_3 を用いた。一般に塩類溶液抽出では全 N は水と殆んど同じで、又 N 組成についても同様である。高濃度では TCA-N が見出されたのは蛋白質の溶出効果の為とも考えられ、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ の S-N が多いのは酸性の為と考えられる。アルカリ抽出は高濃度の場合には酸抽出と同様な N 組成が得られるが、次第に薄くなっても S-N が少いの TCA-N が得られ、(TCA-N+PTA-N) の値が S-N と大差ない。これは TCA では沈澱しないで PTA では沈澱する如き N 物が殆んど溶出されていない事を示すもので、換言すればアルカリ抽出による N 区分は不連続である事から、この TCA-N は酸抽出の TCA-N とは質的に異なるものを含むのではないと思われる。

アルコールは酒母中の濃度に準じて行ったが水抽出と変りない。

以上各種の抽出剤による結果から山麩酒母の初期には酸性に溶ける N 物が生成され、酸性が強くなるにつれて高分子の N 物が溶出する。この場合乳酸は N 物の溶出に好適な特性を有するような結果を得た。中性に於ては如何なる方法によっても抽出 N が多くならない。即ちこの時期に生成される N 物は前報の如く中性では溶解せず、又吸着現象もあまりないように思われる。

第 5 表 TCA-N 区分の変化

		抽 出 時			5 時間後		1 日	3 日
		S-N	TCA-N	PTA-N	TCA-N	PTA-N	PTA-N	PTA-N
		mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
N/20	乳 酸	177	64.5	50	—	77.4	98.2	114.0
N/100	塩 酸	172	47.5	60	—	80.2	105.0	120.5
1.5N/20	クエン酸	183	64.5	66.5	—	72.5	94.0	111.5
N/10	コハク酸	174	59	50.8	—	90.0	106.5	123.5

分析値はすべて酒母 100 g 中の N mg.

前報に於て乳酸抽出により得られる TCA-N 区分は酸性に於て非常に消化分解されやすい事を報告したが、これについて乳酸、塩酸、クエン酸、コハク酸抽出

出液についてその消化様式を検討した。試料の関係でフォルモールの変化を測定しなかったが、第 5 表の如くいづれの抽出物も TCA 区分は 20° でやはり 5 時間後には消失し、僅かに PTA-N を増加している。これが 1 日後更に 3 日後には次第に増大し、抽出時に全 N の約 30~40% であった PTA-N が 3 日後に約 70% を占めるに至り、酸の種類によって消化様式に差がない。この事実も山麩酒母の初期に現われる TCA 沈澱 N は酸性で可溶、しかも分解されやすい事を示すものである。

考 察

前報に於て山麩醗と速醗醗との N 組成の相違の原因は両者の製造工程に於て中性期間の存否が大きな影響を及ぼしている事を各種のモデル酒母を用い、又抽出方法を水及び乳酸によって行って報告した。そして山麩醗の初期即ち中性期間に於ける N 物の変化を検討するに当って先ず抽出条件を検討すべき事を指摘し、本報に於て種々の抽出剤を用いて抽出 N 量及びその組成を比較した。その結果山麩醗の初期にはその N 物は中性にては溶けないが、pH が下るにつれて次第に溶出されるようになり、しかもこの物質が酸性でプロテアーゼの作用を非常によく受ける事を明かにし、前報に於ける結果の正しい事を証した。

この中性期間に生成される酸可溶の N 物は蒸米より来るか、麴に起因するか不明であって、米の蛋白質で酸可溶性のものは成書に記載がないのでその生成過程を今後検討する考えである。

又この N 物は前報で次第に増加していく事を報告したが、量的には勿論質的にも変ってゆく事はモデル酒母に酸添加の時期を異にすると生成アミノ酸量が異なる事からも知られる(続報する)。又 0.1% 乳酸抽出液中に TCA-N 区分が出たり、出なかったりする(第 3 及び 4 表)事からも知られるが、これは主として酒母育成中の温度(麴の酵素力を検討していないので不明)が大きな影響を及ぼしているように考えられる。

第 3 表に於て 0.1% 乳酸抽出を行うと、抽出液の可溶性 N は増大する。即ち酵素作用が進行しているが、TCA-N は消失せずにはば一定に保たれる。一方 0.5% 乳酸ではこの区分 N は次第に消失してゆく。この事実は稀薄乳酸酸性 (pH 4 附近) の様な温和な条件での N 物の消化様式を示唆するものではなからうか。実際に山麩酐では速醗酐と違い色々な状態を連続的に通るものであるからその N 物の変化を追究するという点で物理化学的条件と酵素作用、更に酵素分解の中間生成物との関連を考察するのによい一例であると考えるが、兎に角酒母中の N 物の状態を知る為には以上の結果より、水及び 0.5% 乳酸抽出法と更にこの中間の 0.1% 乳酸抽出法とを採用すれば良いと考える。

結 語

山麩酐の初期の中性期間に於ける窒素物の変化を検討するに当って、各種の酸類、緩衝液、アルカリ類、無機塩類及びアルコールによって窒素物を抽出比較した。その結果この期間に生成する窒素物は前報で示した如く中性では不溶性で、酸性で溶出され、容易に分解されて低分子物質に移行する物質である。

酒母中の窒素物の変化の検討に対する抽出法には水と 0.1 及び 0.5% 乳酸溶液にて行えばよい。

酒母の窒素成分の定量に Folin のフェノール試薬による比色定量法が用い得る事を明かにし、ケルダール法によっていた窒素定量法を簡易化した。

終りに臨み終始御指導いただいております山田所長、Folin 法に対しての結果をお教えいただきました三楽酒造研究室乾氏、実験に協力願った当所助手山尾和也、千野潤雄君に深謝します。

(1) 山田正一篇：酒類，59 頁 (昭 31)。

(4) 江上不二夫等篇：標準生化学実験，209 頁 (昭 28)。

(2) 杉田 脩，国定則行，藤山公雄：醗酵工学，34，1，138 (1956)。

(5) 乾 泰治：昭和 31 年 5 月合成清酒技術者大会講演。

(3) 秋山裕一：本誌，31，913 (1957)。

ブタノール 醗 酵 (第 20 報)*

糖蜜の醗酵 (その 1) ワイツマン型菌株の使用

本 江 元 吉 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 9 月 16 日 受 理

ブタノール醗酵工業の主原料は、1936~7 年頃を転期として、澱粉質から糖質に移ってきた。すなわち、澱粉質原料に比べて市価が安いために、糖蜜を用いようとする試みがまず欧米諸国に起って成果を収め、本邦でも戦後には糖蜜を原料にするようになった。原料が変わったとき、まず考慮されたのは菌株である。それまでの間澱粉質に対して使用してきたワイツマン型の菌株を用い続けるべきか、それとも新に糖質の醗酵に適した菌株を検索分離して使用すべきか、動向は二つに分れた。著者はその頃からこの二方向を検討し、ワイツマン型菌株の不適性を知り、本邦の土壌から糖蜜醗酵に適する菌株の分離につとめ、得られた数菌株の諸条件を検討し、50 石仕込みの中間工業試験を経て千石仕込みにまで及んだ。その経過の間に得られた工業的技法についての知見を本報以下に続報する。

上の二方向のうち、醗酵条件を検討改良してワイツマン型菌株を用いようとする努力は早くから行われ、諸種の栄養物添加⁽¹⁾や穀類との混合仕込み⁽²⁾が検せられた。本報では、この型の菌株について、糖蜜の醗酵での移植による醗酵速度の増進、育成の困難性、経済的にみた不適性などについて報ずる。

実 験

使用菌株：単孢子分離によって純粋にした *Clostridium acetobutylicum* 314⁽³⁾ と *Clostridium kainantoi*⁽⁴⁾ (以下それぞれ 314 株、KN 株と略記)。糖蜜：フィリッピン産糖蜜 (blackstrap molasses)。

I. 大豆粕を添加した醗酵

同じ *Clostridium acetobutylicum* であっても、ワイツマン型の菌株は、糖蜜醗酵適型菌株 (後報) に比べて、

* Butanol Fermentation. Part XX. Fermentation of Molasses. (1) Use of Weizmann Type Strain. By Motoyoshi HONGO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)