(5) 生育に必須な栄養源を培地に制限添加し、菌の生育度とラセミアーゼ形成度との関係を調べ、概して生育の良い時酵素形成も大きいことを認めた。

(6) ラセミアーゼをもたぬ菌株の二次的ラセミアーゼ形成についても検討し、ラセミアーゼの形成はいろいろの段階を経て行われることを知った。

(昭和 32 年 4 月、日本農芸化学会大会にて発表)

(1) 大林 晃, 北原覚雄: 本誌, 33, 623(1959).

(2) 大林 晃, 北原覚雄: 本誌, 33, 832(1959).

(3) 片桐英郎, 北原覚雄: 本誌, 14, 1072(1938).

(4) 片桐英郎, 今井和民, 杉森恒武: 酵素化学シンポジウム, 10 集, 203 (1954).

(5) H. Katagiri, K. Kitahara: *Biochem. J.*, 31, 909 (1937).

(6) 大林 晃, 岩野貞雄, 北原覚雄: 日農化関東支部例会講演, July, 1958.

生醃系酒母中の乳酸菌々相を決定する因子*

大林 晃, 北原覚雄 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 4 月 1 日 受理

緒 言

生醃系酒母に分布する乳酸菌は殆どが *Leuconostoc mesenteroides* と *Lactobacillus saké* で、一般に前者は酒母育成の初期に、後者はやや遅れて現われる。これ以外では *L. batatas* が時折見られるほか *Streptococcus*, *Pediococcus* に属するものや *L. plantarum* などが極めて稀に認められるに過ぎない⁽¹⁾。このように上記二種が酒母中に卓越する理由は未だ不明であるが、個々の乳酸菌の生理がその分布を支配する顕著な例として生態的に興味深い。

著者等は *L. saké* のラセミアーゼの研究に於て、この菌種が普通乳酸菌に用いる半合成培地 (アミ酸類の代りにカゼインの塩酸水解物を使用) には生育せず、ある種のペプチドを要求すること⁽²⁾、麴汁に比べ清酒中にこの種ペプチドが約 5 倍量も存在すること、また糖化作用を充分進めた麴汁には生育しなくなることを認めた。従って *L. saké* が酒母中に分布するためにはその生育因子たるペプチドの消長が問題になると考え、先ずこの因子の成因を検討した。然しこの麴ペプチドが特殊菌 *L. saké* の増殖を支配してはいるものの、これが酒母の flora を定める積極的な因子となり得ないことは自明であって、結局上記二種の菌が他の乳酸菌に較べ低温で生育し得るため、低温で育成する酒母中に卓越的に存在するとの結論に達した。本報ではその経過を報告する。

実 験 及 結 果

I) *L. saké* の生育因子の消長 *L. saké* の生育因子が普通に用いる麴汁に比べ清酒中に多量存在するのは

第 1 表 麴汁への生育因子、醋酸曹達添加の影響

菌 株	添加物	2% 醋酸曹達			
		—		—	
		—	生育因子*	—	生育因子
<i>L. saké</i>	T. S.	0.30	0.80	0.55	2.35
"	C 09	0.55	1.15	1.75	2.70
"	G 01	0.65	0.90	2.15	2.90
"	O 12	0.20	0.95	1.55	2.85
<i>Leuc. mesenteroides</i>	S-1	1.50	1.35	4.00	4.30
"	S-2	1.50	1.50	3.50	4.10
"	G	0.55	0.80	1.40	2.30
"	K	1.15	1.20	2.40	3.05
"	B 07	1.00	1.10	3.30	3.65
<i>L. plantarum</i>	11	1.75	2.00	4.65	4.65

30°, 3 日, 5 ml 培養, 数字は N/10 NaOH の滴定数

* 生育因子: カゼインの Trypsin digest より活性炭吸着後, 醋酸エチル飽和水による溶出部⁽²⁾

何に原因するのか、即ち麴菌によるのか、酵母、*Leuconostoc* 等に起因するのかわかることは酒母でのこの菌の消長を論議すること手掛りになると考え、麴汁調製の条件とこの生育因子の消長の関係を検討した。

1) 予備実験: 普通の麴汁および 2% の醋酸曹達を含む麴汁に生育因子を添加し、*L. saké* の生育を *Leuconostoc mesenteroides* 及び麴汁によく生育する *L. plantarum* と比較した(第 1 表)。 *Leuconostoc* の 5 株及び *L. plantarum* では生育因子の影響は殆どないが、*L. saké* では生育の増

* On the Factor Determining the Flora of Lactic Acid Bacteria in the Starter of Saké.

By Akira ÔBAYASHI and Kakuo KITAHARA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

第 2 表 米麴糖化条件と *L. saké* の生育度

糖化条件		0°			45°	
		pH 3.5	pH 7.0	pH 7.0 及 3.5*	pH 3.5	pH 7.0
<i>L. saké</i> T. S.		3.25	1.00	2.70	2.60	0.85
" C 09		4.00	1.40	3.10	3.10	0.95
" G 01		3.35	1.25	3.00	2.70	1.00
" O 12		3.40	0.90	2.70	2.75	0.75
<i>Leuc. mesenteroides</i> S-1		5.80	5.33	5.80	4.90	5.35
" S-2		6.15	5.33	5.85	5.40	5.45
<i>L. plantarum</i> 11		5.45	4.80	5.20	4.80	5.10

30°, 3 日, 5 ml 培養 数字は N/10 NaOH 滴定値

* 72 時間 pH 7.0 で糖化後 pH 3.5 で 24 時間糖化を行う。

第 3 表 麴汁, 清酒中の *L. saké* の生育因子

菌株	添加物量 (ml/ml)	pH 3.5 糖化麴汁*		pH 7.0 糖化麴汁*		清 酒	
		0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02
<i>L. saké</i> T. S.	0	0.65	1.15	0.10	0.20	0.45	0.80
" C 09	0	1.00	1.45	0.10	0.25	0.50	0.95
" G 01	0	0.65	1.10	0.15	0.20	0.40	0.70
" O 12	0	0.50	1.00	0.10	0.20	0.30	0.55

基本培地: 半合成培地 培養: 30°, 3 日, 2 ml 数字は N/10 NaOH 滴定値

* 麴汁は各々糖度 20% として使用

結果は第 2 表に示されるが, 温度には関係なく pH 3.5 の場合は pH 7.0 におけるより遙かに生育度がよく, 0°, pH 7.0 で 72 時間糖化 (この場合目的が蛋白分解にあるので正しくは「消化」とすべきであるが, 混乱を避けて慣例に従い糖化という字を敢て用いた。以下同様) した *L. saké* の生育のよくない麴醗を pH を 3.5 に調節して更に 24 時間糖化して得た麴汁では生育度の上昇が認められるので, 生育因子の生成は麴菌の酸性プロ

大が認められ, 麴汁での *L. saké* の生育度は生育因子量に左右されると考えられるので, 以下麴汁中の生育因子量はその麴汁での *L. saké* の生育度で判定することにした。また醋酸曹達存在下ではこの傾向が更に増幅されるので, 爾後は醋酸曹達を添加して実験することにした。

2) 米麴の糖化行程における温度と pH の影響: 麴菌の酸性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼに着目し, pH 3.5, 7.0, 温度 0°, 45° の 4 つの組合せで米麴糖化行程中の生育因子の消長を見た。即ち, 米麴 40 g に水道水 120 ml を加え, pH を苛性曹達, 乳酸で調節, トルエンを添加, 0° で 72 時間, 45° で 36 時間糖化後, 濾過, 初糖を 3.5% (葡萄糖として) になる様に稀釈し, 2% 醋酸曹達を添加し培養に供した。

ロテアーゼの作用によると考えられる。

更に半合成培地に pH 3.5 及び 7.0 で糖化を行った麴汁又は清酒を添加し, *L. saké* の生育度を比較した結果 (第 3 表) とも併せ考え, 清酒中にこの生育因子の多量存在するの, 麴菌の酸性プロテアーゼが醸造中に強く作用するためと解釈して間違いないと思う。

II) 米麴醗中の乳酸菌の生育 以上の実験から酒母育成の際 *L. saké* の生育因子が多量に現われるのは, 酸性での米麴の digestion に起因すると考えられる。即ち酒母に於て始め *Leuconostoc* が繁殖して酸性化すると, 生育因子の形成が促される結果 *L. saké* の生育がより円滑に始まると解釈できる。然しこれでは *L. plantarum* を始め麴汁によく生育できる他の乳酸菌が混入して来ない理由の説明にはならない。そこで次に酒母育成の条件を考慮に入れて検討を進めた。

1) *Leuc. mesenteroides* と *L. saké* の混合培養: 上記の実験に用いた米麴は市販の種麴を用いて常法で調製したので, *Aspergillus oryzae* 以外の菌の混入を避け得ない。従って雑菌に基因する問題の混乱及び複雑化を防止するため三角フラスコ内で蒸米を加圧殺菌後純粋培養した *Asp. oryzae* を接種して米麴を調製した。この麴にても前回と同じ生育因子の消長のあることを確認したので, 蒸米 150 g より得た純粋な麴に

第 1 図 米麴中の乳酸菌の生育

[A] *Leuc. mesenteroides* S-1 [B] *L. saké* O 12[C] *Leuc. mesenteroides* S-1 と *L. saké* O 12

Acid: 滴定酸度 Formol: フォルモール滴定

Leuc., *L. saké*: 夫々 *Leuc. mesenteroides*, *L. saké* の生菌数

.....: 計数不可能にて大体の傾向を示す。

第 4 表 米麴醗中での各種乳酸菌の生育

菌 株	温 度 日 数 (day)	pH										滴定酸度 N/10 NaOH ml/10 ml	formol 滴定 N/10 NaOH ml/10 ml
		5~12°					15~20°						
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	20	20
<i>L. plantarum</i> 11		5.5	"	"	"	"	"	"	5.0	3.5	3.4	11.50	5.60
<i>L. arabinosus</i>		5.5	"	"	"	"	"	"	4.0	3.5	3.4	12.25	5.60
<i>L. japonicus</i>		5.5	"	"	"	"	"	"	4.0	3.5	3.4	12.55	5.30
<i>L. xylosus</i>		5.5	"	"	"	"	"	"	4.4	3.5	3.4	6.40	5.25
<i>Pc. hennebergi</i>		5.5	"	"	"	"	"	4.5	3.8	3.5	3.4	7.70	6.80
<i>L. brevis</i>		5.5	"	"	"	"	"	"	"	"	4.0	3.20	3.85
<i>L. batatas</i> B 04		5.5	"	"	5.0	3.4	"	"	"	"	"	7.95	4.55
<i>L. delbrückii</i> 1		5.5	"	"	"	"	"	"	"	"	"	1.90	3.00
<i>L. saké</i> T. S.		5.5	"	"	5.0	4.6	4.0	3.8	3.4	"	"	5.10	6.00
" C 09		5.5	"	"	4.2	3.4	"	"	"	"	"	6.75	6.05
" G 01		5.5	"	"	"	"	"	4.5	4.0	"	3.4	5.75	6.05
" O 12		5.5	"	5.0	3.4	"	"	"	"	"	"	8.30	5.40
<i>Leuc. mesenteroides</i> S-1		5.5	"	4.6	3.4	"	"	"	"	"	"	7.75	3.75
" S-2		5.5	"	4.2	3.4	"	"	"	"	"	"	8.90	4.60
" G		5.5	"	"	4.4	4.2	4.0	"	"	"	"	5.60	6.90
" K		5.5	"	"	4.4	4.0	3.6	"	"	3.5	"	7.30	5.50
—		5.5	"	"	"	"	"	"	"	5.2	"	1.00	2.00

第 5 表 各種乳酸菌の生育最低温度

生育に要する日数

培地温度	麦汁-ブイヨン					麴 汁				
	25	20	15	10	4	25	20	15	10	4
<i>L. plantarum</i> 11	1	1	3	14	—	1	1	5	—	—
<i>L. arabinosus</i>	1	1	3	12	—	1	1	3	±	—
<i>L. japonicus</i>	1	1	3	11	—	1	2	3	—	—
<i>L. xylosus</i>	1	1	3	10	—	1	1	2	—	—
<i>Pc. hennebergi</i>	1	1	3	6	—	1	2	3	—	—
<i>L. brevis</i>	1	2	6	—	—	2	2	—	—	—
<i>L. batatas</i> I 05	1	2	2	9	—	2	3	5	—	—
" B 02	1	2	2	6	—	1	2	3	—	—
" B 04	1	2	2	5	—	1	2	3	6	—
<i>Sc. faecalis</i>	1	2	2	5	—	1	1	2	6	—
<i>L. casei</i>	1	2	3	9	—	1	2	5	—	—
<i>L. delbrückii</i> 1	1	3	—	—	—	3	—	—	—	—
<i>L. thermophilus</i> A	1	2	3	—	—	2	2	6	—	—
<i>L. saké</i> T. S.	1	1	2	5	14	1	1	2	6	±
" C 09	1	1	1	3	9	1	1	3	6	±
" G 01	1	2	6	10	—	1	1	5	12	—
" O 12	1	1	2	4	12	1	1	4	7	±
<i>Leuc. mesent.</i> S-1	1	1	1	3	7	1	1	1	3	9
" S-2	1	1	1	3	7	1	1	1	3	7
" G	1	1	2	7	—	1	1	2	7	±
" K	1	1	1	3	9	1	1	1	3	7
" B 07	1	1	1	3	7	1	1	1	3	9

—: 生育は認められず ±: 20日後僅かに生育が認められる

(B) に示される如く以後添加菌の増加は認められなかった。

(ii) *Leuc.* S-2 と *L. saké* C 09 の混合培養: (i) の場合と殆ど同じ。(iii) *Leuc.* G と *L. saké* O 12 の混合培養: *L. saké* のみが生育し *Leuconostoc* は最後迄検出し得なかった。(iv) *Leuc.* S-1 と *L. saké* G 01 の混合培養: 上とは逆に *L. saké* は検出されなかった。

(iii), (iv) の結果はさて置き, 酒母中で或乳酸菌が生育し或程度酒母が酸性になると, 以後他の乳酸菌は殆んど生育し得ないと思えるのが妥当であり, 酒母中の乳酸菌の flora を決定するのは麴醗中での生育の早さが問題になると思われる。

2) 各種乳酸菌の生育と温度の関係: 純粋な麴 20 g に殺菌水 40 ml を加え, 各菌株を約 10^3 cells/flask 接

殺菌水 250 ml を加え乳酸菌の接種を行い, その菌数, 酸度, 更に遊離のアミノ酸量 (Formol 滴定) を日を追って測定した。

菌株としては蔗糖培地で粘質を形成する *Leuc. mesenteroides* の三株 S-1, S-2 及び G と数株の *L. saké* を用い, 菌数検定には稀釈による colony count 法を用いたが, この際集落の粘化の有無で両菌種を判別計測した。菌数に $10^3:1$ 以上の開きのある場合は劣勢菌は計測できなかった。

(i) *Leuc.* S-1 と *L. saké* O 12:

第 1 図 (A), (B), (C) に見られる如く, 単独の場合も, 混合培養した時も *L. saké* O 12 の生育は *Leuc.* S-1 より 1~2 日遅れるが, 夫々両菌株は独立に充分生育し, *L. saké* の生育が *Leuconostoc* の生育に従属しているとは言えない。また両菌株が各々単独に生育して pH が 4.0 に低下した 4 日, 5 日目に夫々の対立菌株を約 10^6 cells/ml になる様に添加しても, 第 1 図 (A),

種, その生育を pH の変化で調べた結果 (第 4 表), 5~12° に放置した場合 *Leuconostoc* は 4 株共 3~4 日後に, *L. saké* は G 01 以外はこれに 1 日遅れて充分生育し, *Leuc. S-1* は 4 日後に 10^8 cells/ml, *Leuc. K* は 10^6 cells/ml の菌数に迄繁殖していた. 其他の菌種では *Lactobacillus batatas* B 04 が *L. saké* と殆んど同じ位生育している他は温度を 15~20° に上昇させて始めて繁殖が起る.

勿論, これ等の結果で硝酸還元菌等の混入している酒母中の乳酸菌について云々するのは早計であらうが, 温度の問題が浮び上って来る. 此の温度の影響は直接のものか, 温度上昇のため麴醗の成分が変化する間接的なものの何れかであろう. そこで同様に麴醗を 5~12° に乳酸菌の添加なく 3 日放置後無菌濾過し, 各菌株を接種, 30° にて培養すると使用した菌は何れも充分に生育した. この結果乳酸菌の生育温度による栄養要求の差異の有無は別として⁽³⁾, 酒母の乳酸菌の消長はその菌の生育温度に大きく支配されていると考えられる.

III. 各種乳酸菌の生育の最低温度 乳酸菌の生育の最低温度の意義については従来余り検討されてないので, 麦汁-ブイヨン, 麴汁にて各種乳酸菌の生育の最低温度を比較した (第 5 表).

麦汁-ブイヨンは麴汁より乳酸菌類の生育に適した培地であるが, 温度と生育との関係は両培地共平行的で, 低温度で生育するのに麴汁にある種の栄養素が不足するというような現象は認められない. 即ち *Leuconostoc* 及び *L. saké* は 4° にても生育可能であるという明確な特性が看取される外, 一般菌種では球形またはこれに近い形態のものが比較的低温で生育できる傾向があるようである.

考 察

酒母中での *L. saké* の繁殖はこの菌の生育因子の消長に支配されはするが, この事実を以てしては *L. saké*, *Leuc. mesenteroides* が酒母中に特異的に存在する点の説明には余り役立たず, これらの菌の低温での生育度こそ支配的であるという極めて平凡な結論となった. 従って温度より見た場合, 生醗系では酒母育成の際, 始めの 2, 3 日 5~6° に放置する所謂「打瀬^{うたせ}」なる操作をするが, この間に低温による菌種の淘汰がなされ, ここに優位を占めた *Leuconostoc* 及び *L. saké* は爾後温度の上昇につれて盛に増殖し, 酸度を増加する. かくて他の乳酸菌の混入増殖する機会は失われるであろう. 酒母中から比較的低温で生育し得る *L. batatas*, *Pediococcus*, *Streptococcus* などが時折検出される理由も容易に説明されよう.

また *Leuconostoc* と *L. saké* の麴醗中での混合培養の実験で i) *Leuc. S-1* と *L. saké* O 12 の組合せでは S-1 が先に生育を始めるが, pH が低下する前に O 12 の生育も起っている. iii) *Leuc. G* と *L. saké* O 12 では O 12 が G の生育前に充分生育, 生酸し G は生育出来ぬ. iv) *Leuc. S-1* と *L. saké* G 01 では S-1 が早く生育し, G 01 は生育し得なかった. と説明される. 従って低温で酒母を育成した場合は乳酸菌の殆んどが *Leuc. mesenteroides* であり, 育成温度がやや高くなると *L. saké* が増加し, 次いで *L. batatas*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, 更には *L. plantarum* 等が混入して来るのではないかと推察される.

また麴醗で各乳酸菌が充分生育した 20 日後の formol 滴定値は生育, 即ち生酸の遅かった菌株の醗が比較的多く, 酒母中のアミノ酸に関しては秋山の説⁽⁴⁾と結果的に一致すると思われる.

要 約

生醗系酒母で *Lactobacillus saké*, *Leuconostoc mesenteroides* の二種が卓越的に増殖する理由に就いて実験を行った.

(1) *L. saké* は生育に或種のペプタイドを必要とし, これが麴汁より清酒中に多量存在するので, 生育因子の酒母中での消長を検討し, これが *Asp. oryzae* の酸性プロテアーゼ作用に由来することを知った.

(2) 純粋に作った米麴に殺菌水を加え, *L. saké*, *Leuc. mesenteroides* の培養をなし, *L. saké* が *Leuc. mesenteroides* に従属して生育するのではなく, 単独でも充分生育することが判った.

(3) これらの兩種は他の乳酸菌に比べ低温 (4°) でも生育可能であることを知ったが, 生醗系酒母に於てこれら兩種が優越する理由は酒母育成が低温度で行われるために外ならぬとの結論に達した.

(4) *L. batatas*, *Pediococcus*, *Streptococcus* に属する菌株が時々酒母中に検出されるのも, これらの菌が *L. saké*, *Leuc. mesenteroides* には劣るが, 比較的低温でも生育できるためであろう.

昭和 33 年 4 月 26 日, 日本農芸化学会関東支部例会で発表した.

(1) 北原覚雄, 福井作蔵, 南川紀敏: 日農化臨時大会口演, 昭和 28 年 8 月 (札幌); 北原覚

雄: 醸造論文集, 11 輯, p. 59 (昭和 30).

(2) 大林 晃, 北原覚雄: 本誌, 33, 832 (1959).

(3) G. J. Kasai : *J. Infectious Diseases*, 92, 58 (1953).

(4) 秋山裕一 : 本誌, 32, 526 (1958).

細菌によるフマル酸より L-グルタミン酸の 生成について (第 1 報)*

菌の分離及び同定について

青木良平, 近藤安弘, 角田俊直, 小川鉄雄 (味の素中央研究所)

昭和 34 年 4 月 7 日 受 理

緒 言

著者らの行った細菌による γ -アミノ酪酸より L-グルタミン酸生成についての研究⁽¹⁾の一環として, T. C. A. Cycle に現れる有機酸を基質とした *B. pumilus* による L-グルタミン酸の生成量を検討した結果, フマル酸より著量の L-グルタミン酸生成が認められた。

周知の如くフマル酸はベンゼンより化学的に容易且つ安価に得られる醗酵原料なので, この事実に興味を持ち, 新たにフマル酸を原料とする L-グルタミン酸生産菌の分離同定を行い, その性状について若干の知見を得たので此処に報告する。

尚詳細なる培養条件の検討, 醗酵経過及びメカニズムの推定については第 2 報以下を参照願ひ度い。

実 験 方 法

使用培地は第 1 表参照, 培養は試験管 (15 mm×170 mm) に 3 ml の醗酵培地を分注, 115°, 10 分殺菌しこれに被検菌株 1 白金耳量を接種, 往復振盪機にて 30°, 3 日間振盪培養し, 生成したアミノ酸をペーパークロマトグラフ (展開剤; ブタノール, 酢酸, 水, 4:1:2) にて定性, バイオアッセイ法により定量した。

実験結果及び考察

I. 自然界よりの新菌分離 第 2 表に示した様な種々の分離試料を M₁ 培地にて平板培養を行い, 発現せるコロニーを M₂ 又は M₃ 培地にて培養生成せる L-グルタミン酸を定量した。

M₂ 培地によるスクリーニングでは試料 60 点より約 400 本のスラントを得, この中よりペーパークロマトにて L-グルタミン酸のスポット顕著なるもの 18 株, 最高収量培養液中濃度 0.8 g/dl, 対フマル酸 20% であった。

又 M₃ 培地でのスクリーニングでは, 試料 551 点より被検菌株約 3,000 本を得, この中より L-グルタミン

第 1 表 培 地 組 成			
M ₁ (分離培地)		M ₂ (醗酵培地)	M ₃ (醗酵培地)
フ マ ル 酸	1 g/dl	フ マ ル 酸	4 g/dl
硫 安	0.5	グ ル コ ー ス	0.4
KH ₂ PO ₄	0.1	KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.02	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.02
寒 天	2	Fe ⁺⁺	2 p. p. m.
NaOH 中 和	pH 7	Mn ⁺⁺	2 p. p. m.
		NH ₃ , NaOH (1:4 中和)	pH 7
			NH ₃ , KOH 等モル中和 pH 7

第 2 表 新 菌 分 離 試 料

I. M₂ 培地によるスクリーニング

果 樹 園, 畑 土	20 点
汚 泥	20 点
腐 敗 臓 器	10 点
腐 敗 果 実	10 点
合 計	60 点

II. M₃ 培地によるスクリーニング

汚 泥	227 点
畑 土	127 点
果 樹 園	115 点
田 甫 土	51 点
腐 敗 果 実	28 点
動 物 排 泄 物	3 点
合 計	551 点

* Formation of L-Glutamic Acid from Fumaric Acid by Bacteria. Part I. On Isolation and Identification of Suitable Bacterial Strains.

By Ryohei AOKI, Yasuhiro KONDO, Toshinao TSUNODA and Tetsuo OGAWA (The Central Research Laboratory of Ajinomoto Co., Inc.)