

## 酵母菌の變異に関する研究 (第2報) 自然變異と菌株保存に就いて

小田 雅夫・若林 謙太郎 (大阪大學工學部醸酵工學教室)

## 緒 言

我々は前報<sup>1)</sup>に於て酵母の誘發變異に就いて若干試験したが、今回は自然變異の問題乃至菌株保存法に就いて試験した。菌株を出来る丈安定な状態で保存する事は學術上又醸酵工業上重要な課題である事は今更論を俟たない。酵母菌株保存の特殊の方法としては古くは HANSEN の蔗糖液法<sup>2)</sup>があり、近くは斜面培養を礦物油<sup>3)</sup>又はパラフィン油<sup>4)</sup>で被覆する方法、又最近では Lyophile 法<sup>5)</sup>等も試みられ、此等の方法の内には相當良い結果の得られるものもあるが、従来から廣く普通に用いられている方法は麴汁寒天又は麥芽汁寒天に累代培養する方法である。此の方法で長く累代培養を繼續する間に自然に變性する傾向のある事が認められているけれども、上述の特殊の方法は或る限られた数の菌株には應用出来るが多數の菌株には實施困難な憾がある故、従來の普通の斜面培養の方法も全く棄て去る事は出来ない。そこで従來の方法を用いる場合如何なる方向に變性を示し、又此の變性を可及的に抑制するには如何なる方法が好適なるかを知る事も無駄でないと考え、先づ適當な培地の選定をする目的で清酒酵母を對象とし、従來一般に廣く用いられた麴汁寒天を Control として之に種々の植物抽出液を添加したもの並びに其の他 2, 3 の培地を用いて累代培養を行つた。本報に於てはそれらの培地で培養した場合の形態的、生理的性質を比較試験した結果、現在迄得られた現象に就いて述べる事にする。

## 實 験 方 法

(1) 菌株: 昭和27酒造年度に於て灘の某酒造場の醪から新に分離した清酒酵母 KM-46<sup>7)</sup>を使用した。本菌株は此の醪に於ける分布が最も多い株であり、香味良好且つ醱酵力旺盛な種類である。

(2) 培地: 累代培養に用いた培地の種類は Table 1 に示す。麴汁に添加すべき植物抽出液は試料の固形分として約1%とした。即ち乾燥酵母10g, 人參90g, 玉蜀黍10.5g, 馬鈴薯45g, 米糠10.5g, の夫々に水道水を加えて300mlとなし、一夜冷蔵庫に放置し20lb, 15分間オートクレーブして後布で濾過する。其の濾液150mlを15°Bg, 麴汁300mlに添加し、寒天2%を加えて約10ml宛分注し、常法により蒸氣殺菌を行つた。使用する迄は寒天斜面の乾燥を出来る丈防止するため低温(12~15°C)に貯藏した。

(3) 培養方法: 供試菌株の麴汁培養をよく振盪して其の白金耳

宛を上記の各培地に接種し、培養温度は15, 25, 30°Cとし、5日及び1ヶ月間隔で移植した。5日間隔のものは Segregation を出来る丈無くする事と Subculture の回数を多く重ねる目的からであり、1ヶ月間隔の方は出来る丈普通の植継ぎ期間に近似せしめつゝ回数を多くしようとしたのである。

(4) 比較試験: 1ヶ月間隔累代培養のものは5次毎に、5日間隔累代培養の方は10次毎に、次の如き事柄に就いて比較試験を行つた。此の際各培養はすべて10°Bg, 麴汁10mlに接種し30°C, 2日間前培養してから各試験に供した。

(a) 細胞形態: 麴汁寒天に接種し30°C, 3日間培養後檢鏡した。長短軸の測定は夫々50個の細胞を任意に選んで行つた。

(b) 培養の特徴の觀察: 麴汁寒天に接種し30°C, 3日間培養したものを麴汁晒膠斜面上に劃線培養し15°C, 40日後に觀察した。

Table 1. The kind of media used for successive subculture of Saké yeast.

Abbreviation	Kind of media
K	Koji extract agar
Y	Koji extract plus yeast extract agar
Ct	Koji extract plus carrot extract agar
Cn	Koji extract plus corn extract agar
P	Koji extract plus potato extract agar
R	Koji extract plus rice bran extract agar
M	Malt extract agar
Rn	Transfer on various solid media in rotation
H	Modified HENNEBERG's solution*
S	Sucrose 10%

\* Glucose 10%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%, pepton 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7aq 0.2%.

(c) 孢子形成: 麴汁寒天に接種し30°C, 3日間培養したものを修正 GORODKOWA 寒天<sup>8)</sup> に接種し30°C, 10日間培養後水を加えて菌體を斜面から遊離せしめ, 適宜に稀釋し血球計を使用して約500個の細胞に就き其の孢子形成率を測定した。

(d) 糖類の酸酵性: 麴汁寒天に接種し30°C, 3日間培養した後 LINDNER 小酸酵試験法により檢べた。

(e) 酸酵力: 10<sup>7</sup>Bg, 麴汁10mlに接種し30°C, 2日間前培養したもの0.5mlを Glucose 15%, K-citrate 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.8%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.56%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3aq 0.16%, MgSO<sub>4</sub> · 7aq 0.05%, Yeast extract 0.4% なる組成の培地<sup>9)</sup> 100mlに接種し, ALWOOD 酸酵管を附して30°Cに靜置し1日1回振動して減量を秤つた。

(f) 香氣: 10<sup>7</sup>Bg, 麴汁50mlに一白金耳を接種し20°C, 5日間培養後, 練達した14人の鑑定者に依頼して官能的に比較した。

### 實驗結果

#### (1) 移植培地上の發育狀態

5日間隔移植の場合第30次培養迄を通じて異形状細胞及び孢子形成は認められなかつた。Table 2 に示す如く

Table 2. Cultural conditions on various media.

Media	Five days' interval						One month interval					
	15°C		25°C		30°C		15°C		25°C		30°C	
	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color	Growth	Color
K	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
Y	+	C.y	++	C.b	++	b.C	++	b.C	+++	C.b	+++	C.b
Ct	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
Cn	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
P	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
R	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
M	+	C	++	C.y	+++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	y.C
Rn	+	C	++	C.y	++	C.y	++	C	+++	C.y	+++	C.y
H	+		++		++		+		++		++	
S	±		±		±		±		+		±	

Note C: cream color; y: yellowish; b: brownish

固形培地での發育は麥芽汁寒天が一番旺盛であり, 各種植物抽出液添加の培地は之に次ぎ, 麴汁寒天は稍々劣つていた。色調は培養温度が高い程黄色又は褐色を帯びて来るが, 特に酵母抽出液添加の培地では其が著しかつた。1ヶ月間隔移植の場合にも發育狀態と色調に関しては前者の場合と同様な事が云えるが, 麴汁寒天 30°C 培養に於ては大型胡瓜形細胞を含有し未發達の Pseudomycelial chains の形成も認められた。すべての固形培地を通じて云える事は25及び30°C培養では接種後3~4週間経過すると極めて僅かではあるが孢子形成を示すが, 15°C培養では1ヶ月後にもそれを認めなかつた。

#### (2) 細胞形態

5日間隔移植の場合異形状細胞は認められないで卵圓形乃至橢圓形であつた。但し Table 3 に示される如く

Table 3. Effect of successive subculture on cell form.

Cell form was represented by the ratio of minor axis to major one of cell. Parent: 0.78

Media	Five days' interval									One month interval		
	10th transfer			20th transfer			30th transfer			5th transfer		
	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C
K	0.82	0.78	0.79	0.79	0.80	0.79	0.78	0.77	0.76	0.80	0.77	0.72.
Y	0.82	0.81	0.78	0.86	0.82	0.82	0.80	0.80	0.81	0.73	0.83	0.80

(440)

(小田, 若林) 酵母菌の變異に関する研究(第2報)

Ct	0.83	0.83	0.79	0.79	0.81	0.81	0.87	0.78	0.81	0.77	0.78	0.79
Cn	0.81	0.80	0.77	0.79	0.80	0.82	0.79	0.78	0.81	0.79	0.75	0.76
P	0.78	0.78	0.78	0.81	0.79	0.80	0.79	0.83	0.83	0.83	0.79	0.75
R	0.80	0.83	0.82	0.81	0.78	0.84	0.84	0.82	0.81	0.76	0.77	0.82
M	0.77	0.79	0.82	0.79	0.74	0.82	0.80	0.72	0.78	0.83	0.78	0.74
Rn	0.78	0.78	0.80	0.78	0.80	0.82	0.80	0.79	0.77	0.80	0.74	0.80
H	0.81	0.85	0.86	0.81	0.88	0.89	—	0.89	0.85	0.78	0.82	0.84
S	—	0.83	0.83	—	0.80	0.80	—	0.82	0.82	0.78	0.81	0.78

HENNEBERG 培地で25及び30°C培養に於ては著しく圓味を帯びて来る。1ヶ月間隔移植の場合にも一般に卵圓形乃至橢圓形である。そして麴汁寒天30°C培養には矢張り大型胡瓜形細胞が若干認められた。

## (3) 培養的所見

5日間隔移植の場合 HENNEBERG 培地で25及び30°C培養の劃線培養は其の表面はいぼ状を呈し邊緣も出入著しく明かに異つた状貌を呈していたが、他の培養のものは殆ど同様に滑面であつた。1ヶ月間隔移植の場合にはすべて一様に滑面を呈した。

## (4) 胞子形成

5日間隔移植の場合 Table 4 に示す如く培養温度の影響が認められた。即ち一般に30°C培養のものゝ胞子形

Table 4. Effect of successive subculture on sporulating ability.

Sporulating ability was represented by per cent of sporulated cells on GORODKOWA's agar after 10 days' incubation at 30°C, Parent: 50%

Media	Five days' interval									One month interval		
	10th transfer			20th transfer			30th transfer			5th transfer		
	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C
K	26	18	31	17	14	22	16	10	22	20	10	10
Y	29	25	35	30	15	33	27	7	35	23	29	43
Ct	19	28	20	16	27	22	13	32	24	36	32	35
Cn	23	30	33	20	21	24	20	13	33	14	34	14
P	29	18	39	21	16	25	11	10	29	30	13	22
R	18	27	47	15	26	43	14	17	44	32	29	32
M	17	19	40	15	14	26	10	11	24	43	37	25
Rn	25	32	44	24	17	40	21	17	45	37	43	39
H	34	36	49	20	35	41	—	32	49	38	25	33
S	—	40	49	—	37	41	—	46	49	37	30	40

成率は比較的大であるのに対し、25及び15°C、培養では同程度に小なる値を示す。然るに1ヶ月間隔移植の場合には培養温度の影響に關して有意な差を認めなかつた。此の場合には15及び25°C培養のものに於て胞子形成率が前者の場合に較べ大であり、30°C培養に於ては兩者の間に差は認められなかつた。尙1ヶ月間隔移植の場合には麴汁寒天よりも麥芽汁寒天が優れ、又植物抽出液添加の好影響が認められ、特に培地轉換法及び蔗糖液法は胞子形成力を持続するのに最適の様である。細胞形態、培養的特徴、並びに次に述べる酸酵力の點で最も異つた狀況を示した HENNEBERG 培地で5日間隔移植に於ける25及び30°C培養は其の胞子形成率が極めて大であつた事實、並びに5日間隔移植の場合小なる形成率を示した麥芽汁寒天が1ヶ月間隔の場合には寧ろ大なる形成率を示した事實等は注意を惹いた。

## (5) 糖類の酸酵性

5日及び1ヶ月間隔移植の兩者とも親株との差異は認められなかつた。糖類の酸酵性は極めて安定した性質であると云う從來からの見解を支持するものである。

## (6) 酸 酵 力

各培地の培養とも醱酵終了後には大體アルコール7.4Vol%, 残糖0.4%を示し差異は認め難い。従つて接種後3日目に於けるCO<sub>2</sub>發生量を以て便宜上醱酵力を比較する事にした。それはTable 5に示す如く、5日間隔移

Table 5. Effect of successive subculture on fermentation power.  
Fermentation power was represented by CO<sub>2</sub> production in g after 3 days' incubation at 30°C, Parent: 5.1g.

Media	Five days' interval									One month interval		
	10th transfer			20th transfer			30th transfer			5th transfer		
	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C
K	4.4	4.9	4.4	4.2	4.4	4.4	3.7	4.3	4.5	3.6	3.9	4.2
Y	4.8	4.6	4.5	4.4	4.6	4.5	4.2	4.4	4.9	3.4	4.2	4.0
Ct	4.7	4.7	4.6	4.4	4.6	4.4	4.5	4.3	4.2	4.1	4.0	4.0
Cn	4.4	4.5	4.5	4.4	4.5	4.4	4.3	4.5	4.2	4.1	3.8	3.9
P	4.4	4.7	4.3	4.2	4.6	4.5	4.3	4.4	3.7	4.5	3.8	3.9
R	4.4	4.5	4.6	4.5	4.5	4.4	4.5	4.4	4.2	4.2	3.2	3.4
M	4.7	4.5	4.8	4.3	4.2	4.5	4.1	4.0	4.4	3.7	3.7	4.0
Rn	4.6	4.7	5.1	4.5	4.7	4.8	4.4	4.8	4.4	4.7	4.4	4.0
H	4.7	3.5	3.6	4.3	3.2	3.5	—	2.8	3.5	4.1	3.4	4.1
S	—	4.4	4.7	—	4.5	4.5	—	5.1	3.9	4.4	3.9	3.9

植の場合 HENNEBERG 培地で25及び30°C培養は著しく醱酵力の低下を示した事を除いて、一般に培養温度の影響は認められないが、培地轉換法及び蔗糖液法は比較的好適な條件にある。1ヶ月間隔移植の場合にも培養温度の影響は判然としないが、醱酵力を持續するに適したものとしては矢張り培地轉換法であると思われる。HENNEBERG 培地で25及び30°C培養のものは5日間隔の場合非常に劣つた値を示したにも拘らず、1ヶ月間隔移植の場合には著しい低下は認められなかつた。此の點に關しては更に検討を要する。

## (7) 香 氣

香氣の優劣は1, 2, 3の順位で表わし(點數の小なる方が優れている事を示す), 14人の鑑定者の合計順位の大小を以て比較した。Table 6に示す如く HENNEBERG 培地及び蔗糖液法を用いたものが固形培地に較べて香氣が著しく優れている事は興味を惹く。固形培地に於ては植物抽出液添加の影響は判然としないが、25°C培養には香氣の著しく劣つた例(>30)が屢々見出された。そして一般に低温保存(15°C)の方が香氣の點で好適であると思われる。

Table 6. Effect of successive subculture on flavour of Saké. Discrimination of flavour of each culture was represented by the total orders given by 14 sensorial test examiners. The smaller number indicates the order of the better flavour of culture liquid.

Media	Five days' interval at 30th transfer			One month interval at 5th transfer		
	15°C	25°C	30°C	15°C	25°C	30°C
K	23	22	26	28	27	29
Y	22	21	23	23	32	26
Ct	20	25	27	21	32	25
Cn	25	39	22	22	21	24
P	23	26	25	23	24	23
R	26	23	25	22	22	24
M	25	20	26	21	50	27
Rn	20	23	26	25	32	22
H	—	19	20	21	18	21
S	—	22	21	24	21	20

## 考 察

上述の如き諸種の現象論的追究は未だ進行中であり、今後更に Subculture の回数を重ね實驗を繰返さなくては結論的な事は云えない譯である。純系でない酵母は孢子を形成すれば新しい Genotype を分離して變異が現われるから、孢子を作らない中に Diploid を移植する事は必要ではあるが、保存には培地の性質も等閑に附せられないと考える。清酒酵母の保存に從來から比較的廣く使用されている麴汁寒天單獨よりも麥芽汁寒天が優り、更

## (442) (野村, 河野) 夏蜜柑果汁製造に關する基礎的研究(第14報)

に種々の植物抽出液を麴汁に添加する事により變性(退化)が比較的緩慢となる様であり, 特に培地轉換法に於て變性が少いのは成長素其の他必須微量成分の偏奇から救われるためではないかと考える. 又清酒酵母としての香氣の點に關して HENNEBERG 培地及び蔗糖液法が好適であつた事は今後の問題として興味のある事柄であると考え. 之を要するに累代培養による酵母菌株の保存に就いては培地の組成條件が先づ考慮されなければならないが, 更に物理的諸因子も考慮に入れる必要のあるものと考え.

## 要 約

清酒酵母を累代培養して保存する場合に生ずる變性を細胞形態, 培養的特徴, 胞子形成力, 糖類の醗酵性, 醗酵力, 並びに香氣の諸點に就いて觀察した. 其の結果麴汁寒天よりも麥芽汁寒天が稍々優り, 尙麴汁に乾燥酵母, 人參, 玉蜀黍, 馬鈴薯, 米糠等の抽出液を夫々添加すると變性が更に緩慢となる傾向のある事が認められ, 特にそれらの培地轉換法は最も好適な結果を示した. 要するに累代培養による菌株保存には可及的に Segregation の起らない状態, 具體的には本實驗條件では15°Cの低温に置くと共に供試の培地を順次轉換して行く方法が最も良い結果を得た.

終りに酵母培養液の香氣の鑑定を煩わした大阪國稅局鑑定官室長武藤始太郎氏をはじめ同室の各技官の方々に深謝致します.

本研究結果の一部は昭和29年4月開催の日本農藝化學大會に於て發表した.

## 文 献

- 1) 小田雅夫等: 本誌, 32, 373 (1954). 2) KLÖCKER, A.: Die Gärungsorganismen p. 98 (1924).  
 3) HENRY, S. B.: J. Bact. 54, 264 (1947). 4) MORTON, E. H. and PULASKI, J. E.: J. Bact. 35, 163 (1938). 5) HARTSELL, S. E.: Appl. Microbiol. 1, 36 (1953). 6) ATKIN, L. et al: Wallerstein Lab. Comm. 12, 365 (1948). 7) 小田雅夫, 若林謙太郎: 本誌, 32, 289 (1954). 8) LODDER, J. and KREGER-VAN, RIJ, N. J. W.: The yeasts (1952). 9) BLAIR, M. G. and PIGMAN, W.: Arch. Biochem. & Biophys. 42, 278 (1953). (昭和29, 9, 6受理)

## 夏蜜柑果汁製造に關する基礎的研究 (第14報)

## 果汁の褐變機構について(其の4) glucose, glycine 反應

野村 男次・河野 正夫 (山口大學農學部)

## 緒 言

著者等は先に本誌(第10報)<sup>1)</sup>にアミノ酸が此の種褐變に大きい影響を與えることを報告した. この反應は一般に MAILLARD 反應<sup>2)</sup>と呼ばれ, 還元糖とアミノ酸との間の反應として, よく知られている. 然し其の機構については尙推察の域を脱しない部分が多い. 著者等は此の種機構の一部でも明らかにしようと志し, glucose と glycine を各々の代表に選び, 兩者を用いて多少の研究を行つた. この報告は其の結果の一部である.

この種反應の最終産物は高度の重合化合物である黒色の melanoidine と呼ばれる不定形の物質であるが, その生成機構は先にもふれた通り, 必ずしも一定ではない. 然し, 其れらの中で最も妥當とされている機構を簡単に紹介して置く.

先づ反應の第一段階と考えられているのはN-配糖體の形成である. この N-substituted glycosylamine(N-配糖體)の確認は GOTTSCHALK, PARTRIDGE 兩氏等<sup>3)</sup>のペーパークロマトグラフ法によるもの以來多くの研究がある<sup>4)-6)</sup>. 本邦でも最近足立氏<sup>7)</sup>が其の分離に成功している. 尙此の反應は HANNAN<sup>8)</sup>, HAUGAARD<sup>9)</sup> 兩派の研究の結果, 次のような反應機構が示されている.