ソースより分離した一、二の酵母に就て

大 西 博 (野田産業科学研究所)

昭和 25 年 11 月 13 日 受理

Studies on the Two Yeasts Isolated from the Infected Sauce.

By Hircshi ÔNISHI (Noda Industrial Science Laboratory)

ソースは同じく調味食品ではあるが、醤油、味噌の如き醸造食品と異なり、原料の配合後醗酵を俟たずして使用に供せられるので、製造後菌が繁殖して醗酵を起すに至りその品質を粗悪ならしめる嫌悪すべき現象がある。ソース中の醗酵菌に関しては大谷氏⁽¹⁾の研究がある他少い。今回本社塩詰ソースの塩口に太い環状に酵母菌の發育したものがあり、これより一、二の酵母を分離して菌學的諸性質及びソース成分とその發育との關係に就き研究したので茲に報告する。

Zygosaccharomyces sake var.
kikkoman nov. var.
Potato plugs, 30°C, 14 days.

Asporogene Saccharomyces kikkoman
GORODOKOWA-agar, room temperature,
4 months. Spores were not formed.

Fig. 1. Spore Formation

Zygosaccharomyces sake var. *kikkoman* nov. var.

Asporogene Saccharomyces kikkoman

Fig. 2 Photographs of Several Kinds of Sauce which were Infected with the Isolated Yeasts. (After inoculation, 30°C, 1 month)

實 験

〔I〕酵母の分離並びにその菌學的諸性質

1. 供試材料と菌の分離： 試料ソースの成分は食鹽 9.05%，總酸（醋酸として）1.67% にして塩口に太い環狀に酵母の發育したものから常法により麴汁寒天を用い扁平培養を繰返えし、後点滴培養を行い以下の實驗に供した。

2. 分離酵母の形態學的諸性質

i) 細胞の形態： Bilg. 10° の麴汁中に 30° に 5 日間培養した沈澱酵母に就き觀察す。

H1：卵形乃至球（9:1）形にして大きさ $3.5 \sim 6.0 \times 4.5 \sim 8.0 \mu$ ，普通は $4.5 \times 6.0 \mu$ ，細胞は大抵個々分離するが 2~3 個連結するものもあり，内容は一般に均質にして液泡を含まず

H2：卵形乃至楕圓形にして大きさ $3.0 \sim 4.5 \times 4.5 \sim 7.0 \mu$ ，普通は $4.0 \times 5.5 \mu$ ，單一細胞乃至 2~3 個連結するもの多く，長く連鎖するものなし，内容は一般に均質であるが液泡・粒狀體を含むものもある。

ii) 液體培養： Bilg. 10° の麴汁を試験管に採り，本菌を接種して 30° に 15 日間培養，毎日觀察す。

H1：2 日目にして液混濁，發泡を認め 4~6 日にして醗酵著しく 7 日目醗酵衰へ，酵母輪斷片形成す。10 日目にして液透明となり，14 日目にして酵母輪を形成するが皮膜の生産なし，沈澱酵母多量。

H2：2 日目にして液混濁，H1 に比して醗酵緩慢にして 7 日目に至る迄緩かに一様に發泡見られ，10 日目にして漸やく衰える。2 日目酵母輪斷片，7 日目にして酵母輪形成す。14 日目にして皮膜を生産せず沈澱酵母多量。

iii) 穿刺培養： 麴汁晒膠，室溫（12 月→2 月）60 日培養

H1：形殆んど圓形，大きさ 7mm，灰白色中央丘狀に隆起し，放射線明瞭ならず，一つの同心圓明瞭，周邊少しく出入あるが滑らか穿刺溝珠數狀に發育す。

H2：形殆んど圓形，大きさ 8mm，褐灰白色全體僅かに丘狀に隆起し，同心圓放射線不明瞭，周邊概して滑らかなり，穿刺溝鐘乳狀に發育す。

iv) 斜面培養： 麴汁寒天 30°，10 日間培養。

H1：面平滑にして緩かに隆起し，光澤あり，Pale Ochraceous Salmon (XV)⁽²⁾ を呈し，周邊は殆んど圓滑，組織は粘質なり。

H2：面平滑にして隆起し，光澤あり，Pinkish Buff (XXIX) を呈し，周邊は灣入たきも細い短い皺があり粘質組織である。

v) 巨大聚落： 麴汁晒膠室溫（12 月→4 月）160 日培養

H1：聚落の大きさ $25 \times 26 \text{ mm}$ ，周邊殆んど平滑，處々緩かに灣入す。表面光澤なしと雖も多少つやあり，周邊部は Pale Ochraceous Buff (XV) を呈し，中心部は Pale Salmon Color (XIV) なり，表面殆んど平滑，周邊部より中心部に向つて谷がゆるやかに起伏し，火口はない。

H2：聚落の大きさ $24 \times 24 \text{ mm}$ ，周邊殆んど平滑，表面光澤なしと雖も多少つやあり，周邊部は Light Buff (XV) を呈し，中心部は Pinkish Buff (XXIX) なり，表面殆んど平滑，一個の同心圓あり，周邊部に微細な皺があり，中心部は緩かに隆起し，火口はない。

vii) 胞子生産試驗： Bilg. 10° の麴汁を用い三角コルベンで 30° に 4 日間強壯培養した酵母で常法石膏塊上胞子生産試驗を試みたが 30°，7 日間では 2 株共に胞子の形成を認めなかつた。同法の水の代りに 1/8 モル VAN'T HOFF 氏液，5% マンニト，0.1% KH_2PO_4 を用いた場合も 0.5% グルコース添加 1 モル食鹽水を用いた場合も 30°，7 日間では胞子の形成を認め得なかつた。下記の培養法にて H1 に於てのみ胞子の生産を認めた（第 1 圖參照）。

- (a) GORODOKOWA agar 上劃線培養し，30°，3 日間經つた場合
- (b) Carrot plugs 上劃線培養し，30°，14 日間經つた場合
- (c) Potato plugs 上劃線培養し，30°，14 日間經つた場合
- (d) MCKELVEY agar 上劃線培養し，30°，21 日間經つた場合
- (e) Corn meal agar 上劃線培養し，30° に 28 日間經つた場合
- (f) Soil-infusion agar 上劃線培養し，室溫 60 日間經つた場合
- (g) Potato-infusion agar 上劃線培養し，室溫 60 日間經つた場合

H2 にあつては上記 (a)~(g) の各培地にて 30° に 1 ヶ月經過後室溫に 100 日放置しても胞子の形成を認めなかつた。

H1 の場合胞子の形狀大きさは次の如し。

GORODOKOWA agar 30°C, 3 日 : 胞子は球形にして滑面 2.0~3.0 μ , isogamy のもの多く parthenogamy のもの稀にあり, 胞子は 1~4 個, 2 個のものが多い.

Carrot plugs 30°, 14 日 : 胞子は球形にして滑面 2.0~4.5 μ , isogamy のもの多く parthenogamy のもの稀, 胞子は 1~4 個, 2 個のもの多シ

vii) 皮膜の生産 : Bllg. 10° の麴汁を用い, 150cc 容三角コルペンにて 30°, 20 日間培養した.

H1 : 太い凹凸のある白色酵母輪を形成するが皮膜の生産なし

H2 : 白線状の酵母輪を形成するが皮膜の生産なし

3. 分離酵母の生理學的諸性質.

i) 發育溫度 : Bllg. 10° の麴汁を試験管に採り, 本菌を移植し, 各溫度に 14 日間培養す.

Strain	45°C	40°C	35°C	30°C	25°C	20°C	10°C	5°C	Opt. temperature
H 1	—	+	+	+	+	+	±	—	25~35°C
H 2	—	—	+	+	+	+	+	—	25~30°C

ii) 死滅溫度 菌を接種した麴汁試験管を竹籠に入れて湯煎中に浸し, 試験管に寒暖計を挿入したもので溫度を測り, 試験時間經過後 30° に冷却し 30° に 14 日間培養す.

Strain	45°C 30 min.	50°C 10 min.	50°C 20 min.	55°C 10 min.	55°C 20 min.	60°C 10 min.	Extinction temperature
H 1	+	+	+	—	—	—	55°C, 10 minutes
H 2	+	+	+	—	—	—	55°C, 10 minutes

iii) 發育の pH : 麴汁に乳酸及び苛性曹達液を種々な割合に添加したものに菌を移植し, 30° に 14 日間培養す. pH は殺菌後 pH 試験紙を用いて測定した.

pH	2.2	2.8	4.0	5.0	6.0	7.2	8.0	9.2	>9.6	Opt. pH
Strains										
H 1	+	+	+	+	+	+	+	±	—	2.8~7.2
H 2	+	+	+	+	+	+	+	±	—	2.8~7.2

iv) 生酸試験 : Bllg. 10° の麴汁 50cc に菌を移植し 30° に 15 日間培養後濾過して 100cc に充し濾液 50cc に就き phenolphthalein を指示薬として N/20 苛性曹達で滴定した.

Strains	N/20 NaOH(cc) per 50cc of filtrate	N/20 NaOH(cc) per 100cc of original medium [Calculated]
H 1	12.79*	51.16
H 2	10.92	43.68

* 對照試験の値 4.79cc を減じた.

v) 溶膠性の強弱 : 麴汁晒膠上 5~20° の室温に 60 日間斜面培養す.

H1 : 溶 膠 性 ± H2 : 溶 膠 性 +

vi) 酸酵試験 : 600cc の麴汁を容れた 1l 容 MEISSEL 壺にて 30° に培養し, 1 日 2 回宛振盪し CO₂ を驅逐して CO₂ の減量無きに至つて酸酵液を分析した.

Strain	Balling		pH		Direct reducing sugar (Glucose % per 100cc)		Ethyl alcohol (vol.%)	Fermentation Ratio	Cultured days	Weight decreased (g)
	Before inoculation	After fermentn.	Before inoculn.	After fermentn.	Before inoculn.	After fermentn.				
H 1	11.0	2.0	5.4	4.4	9.33	1.45	4.03	67.0%	25	18
H 2	9.5	3.3	5.4	4.6	7.89	2.69	2.76	54.3%	25	14

(註) 酒精は水蒸氣蒸溜後 Iodometry により糖分は BERTRAND 法により分析した. pH は pH 試験紙によつた.

vii) 各種炭水化物に對する酸酵性, LINDNER 氏小酸酵試験法に依つた.

Carbo-hydrate	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Fructose	Mannose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Trehalose	Raffinose	Dextrin	Inulin	Glycogen	Starch	α -Methyl-glucoside	Mannit
Strain																		
H 1	—	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
H 2	—	—	—	+	+	+	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

viii) 窒素同化能否試験 : Glucose 2.0%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% の培地に窒素 0.1g に相當する量の (NH₄)₂SO₄, KNO₃, asparagine, (NH₂)₂CO, peptone を加えた各液を試験管に採つて本菌を接種し

30° に 14 日間培養した。

N-compound		(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	Asparagine	(NH ₂) ₂ CO	Peptone
Strain						
H 1	1	+	-	+	+	卅
H 2	2	+	-	±	+	卅

ix) 酒精同化能否試験 : (NH₄)₂SO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% の培地に無菌的に 3.0% となるように酒精を添加したものを 25cc 宛大型試験管に採つて菌を移植し 30° に 10 日間培養した。

H 1 : 發 育 + H 2 : 發 育 -

4. 分離酵母の分類並びに類縁及び標徴 H1 は 2 個の酵母細胞の接合によつて胞子を形成し、胞子は球形滑面なるによつて *Zygosaccharomyces* 屬に屬し KLÖCKER⁽³⁾ に依れば glucose と saccharose を醗酵し maltose, lactose を醗酵しない Untergruppe B に含まれるものである。KLÖCKER はその中に *Z. Barkeri* SACCARDO et SYDOW; *Z. Nadsonii* GUILLIERMOND; *Z. javanicus* KRUYFF; *Z. mellis acidii* RICHTER; *Z. mandschuricus* SAITO; *Z. Chodati* GUYOT; *Z. paradoxus* BATSCHINSKAJA を擧げている。之等に就て STELLING-DEKKER⁽⁴⁾ の記載を見るに *Z. mandschuricus* は saccharose を醗酵せず *Z. paradoxus* は maltose をも醗酵するので二つを除外し新たに *Z. bisporus* NAGANISHI; *Z. globiformis* KRAEMER et KRUMBHOLZ; *Z. Marxianus* (HANSEN) GUILLIERMOND を加え得る様である。STELLING-DEKKER の記載に基いて上記酵母と H1 との諸性質を比較すると *Z. globiformis* 及び *Z. Marxianus* は含糖培養基上皮膜を形成するに依つて、又 *Z. bisporus* は酵母輪を形成せざるに依つて H1 とは異なる。 *Z. Barkeri*; *Z. mellis acidii*; *Z. Nadsonii* は麦芽汁寒天斜面培養が何れも皺狀にして光澤なく、*Z. Chodati* は細胞やや長型にして大きく、何れも H1 とは異なる。 *Z. javanicus*; *Z. Marxianus* は galactose を強く醗酵する故異なる。大谷氏⁽¹⁾のソースの醗酵菌 *Z. naniwaensis* Forma I-III とは培養的性質は似ているが saccharose を醗酵せざる點で H1 とは異なる。又住江氏⁽⁶⁾の清酒後熟酵母として分離された *Z. sake* SUMINOE と糖の醗酵性を除いて近似している點が多い。長西氏⁽⁶⁾は火落清酒滓から分離され *Z. sake* として分類されたものを maltose, galactose, arabinose を醗酵せずとなし齋藤著醗酵菌類検索便覧中に *Z. sake* SUMINOE は maltose 醗酵性菌種として第 3 類に編入してあるが、第 1 類に編入すべきであると述べている。長西氏⁽⁶⁾の *Z. sake* SUMINOE とせるものは trehalose を醗酵するが、H1 は醗酵せず且つ raffinose の醗酵は極めて微弱なる點の外は類似する點多く、發育の限界溫度も共に高く 40° 附近である。茲に H1 は後記せる osmophile な性質も考慮して *Z. sake* SUMINOE の一變種と見做して *Z. sake* var. *kikkoman* nov. var. と命名した。

H2 は前記諸培養條件にて細胞の接合現象及び胞子の生産を認めないが細胞の大きさも普通 4.0×5.5 μ 位にして橢圓形であり内容に顯著な脂肪球の存在を認め得ず且つ醗酵性を有する等の諸點より一概に *Torulopsis* 屬と認め難く、2 細胞の接合をも認め得なかつたので *Saccharomyces* 屬の無胞子型となして *Asporogene Saccharomyces kikkoman* と命名する。齋藤、長西⁽⁷⁾兩氏及び齋藤、小田⁽⁸⁾兩氏は *Saccharomyces* 屬にあつて又高橋、湯川⁽⁹⁾兩氏及び大谷氏⁽¹⁾は *Zygosaccharomyces* 屬中に無胞子型を認められている。

標 徴

Zygosaccharomyces sake var. *kikkoman* nov. var.

細胞 : 卵形乃至球形 3.5~6.0×4.5~8.0 μ 普通 4.5×6.0 μ

斜面培養 : 2 iv) 参照

巨大聚落 : 2 v) 参照

皮膜の生産 : 麹汁及びソースにて生産せず

溶膠性 : 晒膠を僅かに液化す

胞子の生産 : Gorodokowa-agar; McKelney agar, Carrot plugs; Potato plugs, Corn meal agar 上に生産す

發育溫度 : 10~40°C, 適温 25~35°C

死滅溫度 : 55°C 10分

最適 pH : 2.8~7.2

食鹽に對する抵抗力 : 10%迄

醗酵される炭水化物 : Glucose, fructose, mannose, saccharose, raffinose (弱)

醗酵されぬ炭水化物 : Arabinose, xylose, rhamnose, galactose, maltose, lactose, trehalose, dextrin, starch, glycogen, inulin, α-methyl glucoside, mannit.

酒精に對する發育能否 : 發育す

窒素の同化 : Peptone, (NH₄)₂SO₄, asparagine, (NH₂)₂CO

Asporogene Saccharomyces kikoman

細胞：卵形乃至楕圓形 3.0~4.5×4.5~7.0 μ

普通 4.0×5.5 μ

斜面培養：2 iv) 参照

巨大聚落：2 iv) 参照

皮膜の生産：麴汁及びソースで生産せず

溶膠性：晒膠を液化す

胞子の生産：2 iv) の項の各種培養条件で生産せず

發育温度：10~35°C, 適温 25~30°C

死滅温度：55°C 10分

最適 pH：2.8~7.2

食鹽に対する抵抗力：15%迄

醗酵される炭水化物：Glucose, fructose, mannose, saccharose (弱)

醗酵されぬ炭水化物：Arabinose, xylose, rhamnose, galactose, lactose, trehalose, raffinose, dextrin, starch, glycogen, inulin, α-nalhylglucoside, mannit.

酒精に対する發育能：發育せず

窒素の同化：Peptone, (NH₄)₂SO₄, asparagine, (NH₂)₂CO を同化する

[II] ソースに移植せしめた場合の狀態

試験所試製ソース(成分：糖分 7.33%, 食鹽 8.65%, 總酸(醋酸として) 1.85%)を種々な割合に加水稀釋し glucose, 食鹽を適當に補つた次の 6 種のソースを試験管に約 10 cc 宛採り麴汁に 30° に 3 日間前培養せる沈澱酵母を移植し 30° に 20 日間放置して發育状況を觀察した。

6 種のソースの成分分析結果

Sauce Number	Total acid (as acetic acid)	Direct reducing sugar (as glucose)	NaCl
A	1.85	7.33	8.65
B	1.72	7.17	8.20
C	1.54	6.83	7.80
D	1.38	6.48	7.40
E	1.19	6.30	6.95
F	0.98	5.93	6.55

發育狀況 (第 2 圖の寫眞に下表の發育狀況を示す)

Sauce Number	H 1		H 2	
	10 days	20 days	10 days	20 days
A	no growth	no growth	no growth	no growth
B	no growth	no growth	no growth	no growth
C	growth trace	a shred of yeast- ring formed ppt. little	no growth	no growth
D	a shred of yeast- ring formed ppt. middle	yeast ring formed ppt. middle	growth trace	yeast ring formed ppt. middle
E	yeast ring formed ppt. middle	yeast ring formed ppt. much	a shred of yeast- ring formed ppt. little	yeast ring formed ppt. middle
F	yeast ring formed ppt. middle	yeast ring formed ppt. much	a shred of yeast- ring formed ppt. middle	yeast ring formed ppt. much

[III] 分離酵母の發育に及ぼす各種ソース成分の影響と其の發育防止條件.

1. 食鹽の影響：Bllg. 10° の麴汁に食鹽を 5%, 10%, 15%, 20%, 25% になる割合に夫々添加し試験管に約 7 cc 宛採つて殺菌後に新鮮麴汁培養の沈澱酵母を移植し 30° に 14 日間培養後繁殖の有無を検す。沈澱の生

Strain	NaCl					
	0%	5%	10%	15%	20%	25%
H 1	+++	+++	++	—	—	—
H 2	+++	+++	+++	++	—	—

成は 5% 添加の場合、無添加と差なく、10% にてその差が見られ、15% にては H2 のみ發育し、20% 以上にては共に發育しない。氣泡の發生は食鹽添加量の増加に伴い漸次衰え、5% 區にては醗酵遲延し、10%

區にては極めて微弱となる。酵母輪は食鹽の添加に關せず對照と同一である。

2. 葡萄糖の影響 Bllg. 10° の麴汁に glucose を著量加えて高濃度としたもの約 10cc を試験管に採り殺菌後新鮮麴汁培養の沈澱酵母を移植し 30° に 30 日間培養後發育状況を觀察した。

Strain	H 1	H 2
Glucose %		
50.47%	ppt. much	ppt. much
60.65%	ppt. little	ppt. little
72.08%	no growth	growth trace
81.13%	no growth	no growth

3. 有機酸の影響 : Blg. 10° の麹汁に氷醋酸及び乳酸を種々な割合に添加したもの約 7cc を試験管に無菌的に採り新鮮麹汁培養の沈澱酵母を移植し 30° に 10 日間培養後發育状況を檢した. 酸の%は N/20 NaOH にて滴定して定めた.

Strain	Acetic acid%	Growth	Strain	Lactic acid%	Growth
H1	1.96	—	H1	3.42	—
	1.75	+		2.92	+
	1.55	+		2.32	++
	1.35	++		2.02	++
H2	1.15	++	H2	3.42	—
	1.96	—		2.92	—
	1.75	±		2.32	+
	1.55	+		2.02	++
	1.35	++			
	1.15	++			

尙上記醋酸添加培養液を 35cc 容 EINHORN 氏管に採り新鮮沈澱酵母を移植し 30° に 20 日間放置して醱酵の有無を觀察した.

H1 : 醋酸 1.15%, 1.35% にして醱酵するが 1.55% 以上の場合醱酵せず.

H2 : 醋酸 1.15% にして僅かに醱酵をみとめるが 1.35% 以上の場合醱酵せず.

4. 香辛料に對する抵抗試験

i) 試験其の一 : ソースの香辛料中辛味の強い蕃椒, 生薑, 丁香, 胡椒, 肉桂の 5 種を用い, 此等香辛料 20g (風乾粉末物) を 10% 醋酸液 50cc にて常溫に 1 週間浸出後取り出して濾過し 250cc に充し, これを抽出原液となし Blg. 10° の麹汁に種々なる割合に添加し試験管に約 7cc 宛採り新鮮麹汁培養の沈澱酵母を接種し 30° に 7 日間培養後發育の状況を檢した.

Spices.	Rate of addition of spices	Concentration* of Acetic acid	H 1	H 2
Cayenne pepper	Spices extract 7 : Koji 3	1.4%	+	+
	5 : 5	1.0	++	++
	3 : 7	0.6	++	++
Ginger	7 : 3	1.4	+	+
	5 : 5	1.0	++	++
	3 : 7	0.6	++	++
Pepper	7 : 3	1.4	±	+
	5 : 5	1.0	++	++
	3 : 7	0.6	++	++
Cinnamon	7 : 3	1.4	—	—
	5 : 5	1.0	—	—
	3 : 7	0.6	±	±
Clove	5 : 5	1.0	—	—
	3 : 7	0.6	±	±
	1 : 9	0.2	++	++

* 茲に醋酸の濃度は抽出液の添加割合により計算にて示した.

ii) 試験其の二 : Blg. 10° の麹汁に食鹽, 醋酸を添加したものに粉末の丁香, 肉桂, 蕃椒を 1.5%, 30% 添加したものをよく振つて試験管に約 8cc 宛採り, 新鮮麹汁培養の沈澱酵母を接種し 30° に 14 日間放置して發育状況を觀察す

培地 : 糖分 (Glucose として) 8.54%, 食鹽 9.90%, 總酸 (醋酸として) 0.5%

Spices	Rate of Addition of spices	H 1	H 2
Clove	1.5%	—	—
	3.0%	—	—
Cayenne pepper	1.5%	++	++
	3.0%	++	++
Cinnamon	1.5%	++	±
	3.0%	±	±

iii) 試験其の三 前 2 回の試験にて丁香と肉桂とが酵母の發育を阻止することを知つたので, それからの有效成分たる eugenol, 桂皮アルデヒドに就て試験した. 丁香油及び桂皮アルデヒドを蒸溜水によく懸濁せしめ Blg. 10° の麹汁に種々の割合に添加し, 試験管に採り新鮮酵母を移植し 30° に 14 日間放置して發育を檢した.

	Concentration	H 1.	H 2	
Cinnamic aldehyde	1/100,000	卅	卅	尙直接ソース成分とは関係ないが、これら酵母の發育に對する酒精及び防腐劑の影響を試験した。
	2.5/10000	—	—	
	5/10,000	—	—	
Clove oil	1/10,000	卅	卅	5. 酒精の影響 : Bilg. 10° の麵汁に 96% 酒精を種々なる割合に添加したるもの約 10cc 宛試験管に採り新鮮酵母を移植し 30° に 10 日間靜置し發育の有無を檢した。
	5/10,000	±	±	
	1/1000	—	—	

H 1 : 11.49%迄發育をみとめるが 13.41% にて發育をみとめず。

H 2 : 8.62%迄發育をみとめるが 9.58% にて發育をみとめず。

6. 防腐劑の影響

Antiseptics	Concentration	H1	H2	
<i>p</i> -Oxy-benzoic acid butyl ester	5/100,000	卅	卅	i) <i>p</i> -Oxy-benzoic acid butyl ester : NaOH 液によく溶解せしめ、Bilg. 10° の麵汁に湯煎上 80° 以上に加熱しながら添加す。
	1/10,000	+	±	
	2/10,000	—	—	
Rhodan acetic acid ethyl ester	5/100,000	卅	+	ii) Rhodan acetic acid ethyl ester : 蒸溜水に溶解せしめたものを Bilg. 10° の麵汁に添加す。
	1/10,000	卅	+	
	2/10,000	—	—	
Salicylic acid	5/10,000	卅	+	iii) Salicylic acid : 酒精に溶解せしめて用う。
	1/1000	+	—	
	2/1000	—	—	
Sodium benzoate	5/10,000	卅	卅	iv) Sodium benzoate : 蒸溜水に溶解して用う。 上記防腐劑添加麵汁を試験管に採り、新鮮酵母を移植し 30° に 14 日間培養後發育を檢した。
	1/1000	卅	卅	
	2/1000	卅	卅	

考 察

著者の分離せる一種の *Zygosaccharomyces* 屬は *Zygosaccharomyces sake* var. *kikkoman* nov. var. として分類したが、長西氏⁽⁶⁾に依れば大谷氏⁽¹⁾のソースの醱酵菌として分離した *Z. naniwaensis* Forma I は長西氏が火落清酒滓中より分離された *Z. sake* var. α . nov. var. と極めてよく近似しているとされており、住江氏⁽⁵⁾の清酒後熟酵母として分離された *Z. sake* SUMINOE と共に此等は何れも類似のものとして一括せらるべきものゝようである。

胞子を生産せざる一種は *Asporogene Saccharomyces kikkoman* として分類したが、*Saccharomyces* 屬が無胞子型を生ずるのは單一發芽のみによつて全く胞子の接合なく増殖し、其の後にあつても 2 細胞の融合なき場合に之を形成するのは WING 及び LAUSTSEN⁽¹⁰⁾兩氏の研究によつて明らかにされた。長西氏⁽¹¹⁾は無胞子型は原種よりも細胞小型となり球型に變化し、1~2 年間は胞子の形成がなかつたが其の後數年經過中に形狀原型に復して胞子の形成を認めている。著者の無胞子型酵母は Haploid 型とも斷定し難く胞子形成の點は更に確めることとする。GUILLIERMOND⁽¹²⁾氏は發生學的に *Saccharomyces* 屬と *Zygosaccharomyces* 屬とを遠縁なりとし、STELLING DEKKER⁽⁴⁾女史は兩屬を單に *Saccharomyces* 屬の亞屬としているが WINGE, LAUSTSEN⁽¹³⁾兩氏、HENRICI⁽¹⁴⁾氏等も兩屬を遠縁なりと認め難いと述べている。本酵母は 2 細胞の接合を認めないので *Saccharomyces* の無胞子型とした。

二種共に所謂 osmophile な性質を有し食鹽及び糖に對してもかなりの抵抗性を示し、ソース中の食鹽及び糖の含量程度では充分に繁殖し得る。醋酸に對しては 1.75% 迄發育するがソース中醋酸 2.0% を含むならば醋酸單獨でソースの風味を損はずに菌の發育を防止し得る。

香辛料の防腐效果に就いては古く HOFFMANN 及び EVAN⁽¹⁵⁾兩氏の研究があるが著者の分離酵母に對しては丁香肉桂の有効なることを知つた。更にそれらの有効成分と思われる eugenol, cinnamic aldehyde に就き試験し、夫々 1/1000~5/10000 ; 2.5/10000 にて酵母の發育を阻止し、安息香酸ソーダの如き防腐劑より明らかに有効なることを認めた。

醸造食品の防腐防黴劑として用いられている *p*-oxybenzoic acid butyl ester, rhodan acetic acid ethyl ester, salicylic acid ; sodium benzoate を用いて發育防止試験を行つたが前 2 者にては 2/10,000, salicylic acid にては 1~2/1000 にて有効であつたが sodium benzoate の場合は 2/1000 にて無効であり、何れも醬油の白黴や湧き酵母に對するそれらの如き顯著な效果は認め得なかつた。

ソースを汚染する微生物の侵入経路をたどるに仕込時より以後、新仕込ソース→熟成ソース→製成ソースの過

程を経て製品となる迄の間に桶の周囲及び蓋等に附着していたもの及び空気中の微生物が混入する恐れが最も多いと思われる。先ず第一に可及的に菌の浸入を防ぐためには仕込桶及び燻詰桶は十分に清潔にして用いることが大切であり、浸入したる菌も醋酸の濃い場合は繁殖不可能なる故、醋酸濃度は 2% を下らないよう注意すれば殆んど安全に防止し得ると思われる。次にソースにあつては多種多様の原料を用い而も液状物と雖も比重濃度を異にする各種のものを混合する故仕込時によく全體を攪拌して内容を均一ならしめることが特に工業的大量生産の場合は防黴の見地からしても必要である。香辛料使用上からは丁香・肉桂を比較的多く使用することによつて防黴効果を増進し得ると思われる。

最近市販ソースの品質も目ざましく向上し就中分析上著明なるは糖分に就てであり、かくの如きは品質向上にも拘らず、防黴の見地よりすれば菌の發育及び醱酵に有利となつてゐるものと推定される。即ち著者は Blig. 5° の麵汁に glucose を種々なる割合に添加し、醋酸は一様に 1.06% としたるものを EINHORN 氏管に採り、*Z. sake* var. *kikkoman* nov. var. を用い醱酵試験を行つた結果糖分 (glucose として) 3.97% のものは 14 日後にあつて醱酵を認めないが 11.52% のものにあつては顯著な醱酵を認めた。

かくしてソースの品質と防黴との間には微妙な關係が存するが、これらは今後ソースが嗜好的な調味食品として愛用されるべく進む方向と共に一考されるべき問題であらう。

總 括

(1) 燻詰ソースの燻口に太い環狀に菌の發育したるものより酵母を分離し *Zygosaccharomyces sake* var. *kikkoman* nov. var. と *Asporogene Saccharomyces kikkoman* とに分類した。

(2) 何れも所謂抗渗透壓性酵母であり、市販ソースに於ける食鹽及び糖の含量程度では十分に繁殖し得るが醋酸 1.8% 以上にて有効に發育を阻止し得る。

(3) ソースの香辛料が菌の發育に及ぼす影響を試験して、丁香・肉桂が菌の發育防止に有効であり、蕃椒・生薑・胡椒は無効なることを知つた。

(4) ソースの防黴上・工業生産の場合に拂うべき注意事項に就いて考察を試みた。

終りに臨み御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜つた恩師坂口謹一郎、朝井勇宜兩博士に對して深甚なる謝意を表する。貴重なる文献を御惠與頂いた鳥取大學大谷義夫博士の御好意に拜謝し、有益な御助言を賜つた野田産業科學研究所長茂木正利博士並びに種々御便宜をお取りはかり頂いた試験所長梅田勇雄氏に衷心より感謝する。

- (1) 大谷義夫：釀學，9，645(1931)
- (2) RIDGWAY：Color Standard and Color Nomenclature
- (3) KLÖCKER：Gärungsorganismen(1934)
- (4) STELLING DEKKER：Die Sporogenen Hefen(1931)
- (5) 住江金之：釀學，4，589(1926)
- (6) 長西廣輔：釀學，19，14(1941)
- (7) 齋藤賢道・長西廣輔：滿鐵中試報，6，1(1921)
- (8) 齋藤賢道・小田雅夫：釀學，12，159(1934)
- (9) 高橋偵造・湯川又夫：東農紀要，5，236(1915)
- (10) WINGE & LAUSTSEN：C. r. Lab. Carlsberg, 22, 99(1937)
- (11) 長西廣輔：釀造會誌，22，50(1920)
- (12) GUILLIERMOND：The Yeasts (1920)
- (13) WING & LAUSTSEN：Cited from Bact. Rev., 5, Genetics of Yeasts (1941)
- (14) HENRICI：Bact. Rev., 5, 97(1941)
- (15) HOFFMANN & EVANS：Ind. Eng. Chem., 3, 835(1911)

Summary

(1) The author isolated two yeasts from the infected sauce which form a thick ring along the line of demarcation between the surface of sauce and the top of the bottle, and carried out their microbiological studies and classified them in *Zygosaccharomyces sake* var. *kikkoman* nov. var. and *Asporogene Saccharomyces kikkoman*.

(2) These yeasts show so-called "osmophilic" characters. And so, it is difficult to prevent the growth of these yeasts in usual concentration of sodium chloride or sugar of the marketed sauces, and acetic acid of the concentration exceeding 1.8 per cent is effective in preventing the

infection.

(3) By studying the effects of spices in sauces on the growth of these yeasts, the author found that pepper, ginger and cayenne pepper do not prevent the growth of these yeasts but that cinnamon and cloves are valuable preservatives.

(4) The author made a discussion of the points, for which care must be taken to prevent the infection in the industrial mass production of sauce.

Glutathione に 関 する 研 究 (第 6 報)

Glutathione の定量法中沃度法・Glutathioneの沃度定量に就て

黒 岩 芳 郎 (麒麟科學研究所尼崎分室)

昭和 25 年 11 月 14 日 受理

Researches on Glutathione. Part 6. Studies on the Iodometric Procedure
among the Determination Methods of Glutathione. On the Iodometric
Quantitative Estimation of Glutathione.

By Yoshiro KUROIWA (Kirin Research Institute, Amagasaki Laboratory)

I. 緒 言

自然界に存在する物質であつて酸性溶液に於て沃度と反應しないものとして知られているものは uric acid^(1,2), urea, creatine, glucose and fructose⁽¹⁾, phenol, *p*-aminophenol, *p*-nitrophenol, adrenalin and hydroquinone⁽³⁾, glycine, aspartic acid, alanine, valine, leucine, glutamic acid, proline, tyrosine, phenylalanine, tryptophane, cystine, histidine, arginine and lysine⁽⁴⁾である。又 oleic acid の如き不飽和脂肪酸は CCl_3COOH の場合を除き sulfosalicylic acid (以下 S. S. A. と略す) によつて抽出されない⁽³⁾, Fe^{+++} は HPO_3 によつて抽出されない^(5,18)。酸化型 aneurine は酸性に於て還元型に戻る⁽⁶⁾と云われている。

一方生體組織及び體液に於て酸性溶液にて沃度と反應する物質として知られているものは主として glutathione⁽¹⁾ [以下 GSH と略す], cysteine⁽⁷⁾, thioneine^(8,9) 及び ascorbic acid⁽⁹⁾ であり、生體中の無機物質にて KI と作用して沃度を遊離せしめるものは Fe^{+++} 及び Cu^{++} である。以上の沃度と反應する既知物質中 cysteine は僅少であつて無視し得る量⁽¹⁰⁾ であり、thioneine は人血中 3.8~7.5mg% 存在^(11,12,13) し、平均 5mg% となる。而して WOODWARD and FRY⁽³⁾ によれば約 2% S. S. A. 濃度に於てその 60% が酸化され、即ち 3mg% の誤差を生ずると云われるが故に又僅少である。故に以上の諸事實の綜合結果より生物界に於て ascorbic acid 以外の沃度消費値を以て GSH と見做す所謂 GSH の沃度法は所詮甚だ簡單なるが故に實用的價值を有するものであるが、この GSH の沃度定量は四つの具備條件を必要とする事を特徴とする。

GSH の沃度酸化に於て次の (a), (b) 二式が考えられる。

(a) 式の場合は GSH : I = 1 : 1 であり (b) 式の場合は 1 : 6 となる。又兩式が同時に起り得る事も考えられるが斯くの如き場合には GSH は満足に沃度によつて定量し得ない事は當然であつて、(a) 式の成立條件を得んとして従来研究は續けられ、1929 年 HESS⁽¹⁴⁾ は 20° に於て滴定し 1931 年 KING and LUCAS⁽¹⁵⁾ は pH 6.0 以下温度 25° 以下に於て初めて可能と云い、1932 年 WOODWARD and FRY⁽³⁾ は pH 2 以下 20° 滴定を行い、1933 年に至つて初めて奥田・小川⁽¹⁶⁾ は N/4 S. S. A. 濃度、0° 滴定條件を發見した。1938 年小川⁽¹⁷⁾ 及び藤田・沼田^(18,19) は夫々沃度法を發表するに於て前者は再び N/4 S. S. A. 濃度、0° 滴定を用い、後者は 2% HPO_3 、0° 滴定を採用している。更に (a) 式が成立し GSH の沃度定量が理論値に従うや否や、即ち沃度定量に於て GSH の副分解作用を件うや否やの問題が考えられる。小川⁽¹⁷⁾ は實驗値を採用し藤田・沼田^(18,19) は理論値を採用している。而して實驗値を採用しているのは數多き沃度法中 HESS⁽¹⁴⁾, 奥田・小川⁽¹⁶⁾, 小川⁽¹⁷⁾ 位であつて他の定量法