醤油酵母の研究 (第 2 報) 諸味中の酵母生菌数測定に就て(其の1)

大 西 博 (野田産業科学研究所)

昭和 29 年 3 月 26 日 受理

Studies on Soy Yeasts. Part 2. Methods for Determining Viable Counts of Yeasts in Soy Mash (1).

By Hiroshi ŌNISHI (Noda Industrial and Scientific Research Laboratory)

緒 言 醤油醸造過程に於て原料処理及び製麹の過程は食塩と無関係であるが、仕込後の熟成乃至製成の過程は相当高濃度の食塩の存在下に行われるものである。又仕込後 1~2 ヶ月という熟成の比較的初期の段階において既に相当窒素濃度も高まつて来るが、このような環境下に発育している醤油酵母の生菌数測定に就て二、三の検討を行ったので報告する。

実 験

[I] 醤油酵母の発育と培地の滲透圧との関係 醤油諸味は約 18% 程度の食塩を含有しているので、そこに発育して諸味の熟成に関与する酵母は所謂 osmophilic なものと考えられる。それ故生菌数測定に際しては供試培地の滲透圧に関して若干の考慮が必要であると思われた。

(A) 食塩無添加培地に発育した酵母を NaCl 18% 培地に接種した場合 (Table 1).

供試酵母: *Zygosacch. major*, *Zygosacch. soya*, *Z. sa'sus*, 及び著者が醤油諸味より分離した形態的及び培養的に異なる No. 1~34 の 11 株の酵母で、何れも NaCl 18% 麹汁に発育し得る所謂 osmophilic yeasts である。

供試培地: NaCl 無添加及び 18% 麹汁寒天。

試験法: NaCl 無添加麹汁に 30°, 5日間前培養した酵母の 1~5 白金耳を 50 cc の殺菌生理食塩水にとり、5分間激しく振盪後その 0.5 ml 宛を各培地に接種 plate し、30° に培養した。plate count は各 2 枚宛行い平均値をとった。

Table 1. Fall in Viability by Transfer of Osmophilic Yeasts from NaCl 0% Medium to NaCl 18% Medium.

osmophilic yeasts でも NaCl 無添加の培地に発育 したものを突然 NaCl 18% 培地に接種した場合には個 個の細胞は viability を減 じ、plate 上に発育する colony 数を減ずる結果と なる。このことから麹中に 発育した酵母中 osmophi- lic なものの数を知らうと して直ちに NaCl 18% 培	Strain	Transferred medium*	Cultured days	Colony count per 1 dish	Strain	Transferred medium	Cultured days	Colony count per 1 dish
	<i>Z. major</i>	a	3	992	10	a	3	2088
		b	9	42		b	8	97
	<i>Z. soya</i>	a	3	128	15	a	3	1976
		b	9	1		b	8	89
	<i>Z. sa'sus</i>	a	3	912	21	a	3	2496
		b	9	24		b	8	1704
	1	a	3	588	24	a	3	2016
		b	8	128		b	8	1000
	5	a	3	2640	28	a	3	1432
		b	8	48		b	8	572
	6	a	3	3960	31	a	3	228
		b	7	2768		b	9	78
	8	a	3	1032	34	a	3	3000
		b	8	103		b	8	14

* Transferred medium: a: NaCl 0% Koji extract agar b: NaCl 18% Koji-extract agar
な場合は相当低い値が出ることになる。

(B) NaCl 18% 培地に発育した酵母を NaCl 無添加培地に接種した場合 (Table 2).

供試酵母及び供試培地 (A) と同じ。

試験法: (A) の場合と同じ操作であるが NaCl 18% 麹汁に 30°, 10日間前培養した酵母を NaCl 18% 殺菌水で希釈した点を異にする。

Table 2 の結果より NaCl 18% 培地に発育した酵母を急に NaCl 無添加の培地に接種する時は発育する colony 数を減ずることを知る。この結果より諸味中の酵母生菌数測定を行うには、諸味と同程度の食塩濃度の培地を用いることが必要と考えられる。

Table 2. Fall in Viability by Transfer of Osmophilic Yeasts from NaCl 18% Medium to NaCl 0%. (7~8 days)

Strain	Transferred medium*	Colony count per 1 dish	Strain	Transferred medium	Colony count per 1 dish	Strain	Transferred medium	Colony count per 1 dish
<i>Z. major</i>	a	53	6	a	198	24	a	492
	b	1240		b	426		b	1752
<i>Z. soya</i>	a	32	8	a	174	28	a	232
	b	175		b	1808		b	1280
<i>Z. sa'sus</i>	a	252	10	a	105	31	a	75
	b	674		b	2104		b	492
1	a	8	15	a	464	34	a	14
	b	193		b	2448		b	1464
5	a	152	21	a	560			
	b	1048		b	2544			

* Transferred medium a: NaCl 0% Koji-extract agar. b: NaCl 18% Koji extract agar.

尚上記 (A), (B) の現象は、滲透圧の突然の変化による細胞の plasmolysis 及び plasmoptysis に由るとも考えられるが、GRAY⁽¹⁾ の方法によつて検鏡を行つたが明瞭な変化を観察し得なかつた。

【II】食塩耐性の弱い酵母の NaCl 18% 培地中に於ける viability の減少の状態 麴中に発育した酵母や空中乃至桶等より諸味中に混入した酵母中、食塩耐性の弱いもの及び耐性を獲得し得ないものは諸味中で発育し得ず、逐次死滅に至ると考えられる。これらの酵母を NaCl 18% 培地に接種した場合の viability 減少の状態は Table 3 の如きである。

Table 3. Fall in Viability by Transfer of Non-osmophilic Yeasts from NaCl 0% Medium to NaCl 18%.

Strain	Viable cells per 1 ml of medium			
	0 days	2 days	5 days	8 days
<i>Sacch. sake</i>	6.7×10^7	3.7×10^6	4.2×10^4	3.1×10^2
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	6.1×10^7	2.3×10^4	$< 8.0 \times 10^2$	0

試験法: 100 ml の麴汁に供試酵母を 30°, 3 日間培養後、上澄を捨てて沈澱菌体のみを残し、これに NaCl 18% 麴汁 100 ml を添加して 30° に置く。それより、2, 5, 8 日目に麴汁寒天 plate 法によつて viability の減少の状態を検した。

この結果によれば食塩耐性の弱い酵母を NaCl 18% 培地に接種した場合は短時間内に著しく生菌数を減少することになる。

【III】醤油酵母の生菌数測定と培地の窒素濃度との関係 醤油諸味は仕込後 1~2 ヶ月の熟成期間の比較的初期に、既に Total N は 1.0% 程度になり、以後漸増して 1.5% 位になつているので、そこに発育する酵母の plate count と培地の窒素濃度との関係に就て検討した。

(A) Total N 1.47% 培地に発育した場合。(Table 4)

供試酵母: [I] の場合と同じ。

供試培地: 麴汁寒天 (Total N 0.08%) 及びペプトン添加麴汁寒天 (Total N 1.47%)

試験法 ペプトン添加 Total N 1.47% 麴汁に 30°, 4~6 日間培養した酵母の 1~3 白金耳を 50 ml の殺菌生理食塩水にとり、5 分間激しく振盪後その 0.5 ml 宛各培地に接種 plate した。

Table 4. Influence of Nitrogen Concentration of Medium on the Plate Count of Soy Yeasts (4 days).

Strain	transferred medium*		Strain	transferred medium		Strain	transferred medium	
	a	b		a	b		a	b
<i>Z. major</i>	1496	1504	5	1792	1696	24	976	972
<i>Z. soya</i>	1472	1247	8	628	594	28	664	680
<i>Z. sa'sus</i>	564	564	15	964	916	31	1140	1108
1	1082	1068	21	640	616	34	520	540

* Transferred medium: a: Koji-extracts agar (Total N 0.08%) b: Peptone added Koji-extract agar (Total N 1.47%)

Table 4 に於て a, b 両培地にて colony 数に差を認め難く、高窒素濃度培地に発育した酵母の plate count には必ずしも同様の窒素濃度培地を用いる必要はなく麴汁寒天でもよいと考えられる。

(B) NaCl 18%, Total N 1.40% 培地に発育した場合 (Table 5)

供試酵母: (A) と同じ。

供試培地: ペプトン添加麴汁寒天 (Total N 1.47%); ペプトン添加, NaCl 18% 麴汁寒天 (Total N 1.40

%), NaCl 18% 麴汁寒天 (Total N 0.08%).

試験法: (A) と同様の方法であるが, ペプトン添加, NaCl 18% 麴汁 (Total N 1.40%) に 30°, 15日

Table 5. Influence of NaCl and Nitrogen Concentrations of Medium on the Plate Count of Soy Yeasts (8~10 days)

Strain	transferred medium *			Strain	transferred medium		
	a	b	c		a	b	c
<i>Z. major</i>	440	2056	2040	15	1360	3704	4000
<i>Z. soya</i>	364	1408	1640	21	222	596	652
<i>Z. salus</i>	15	112	118	24	544	2584	3248
1	28	520	556	28	76	1440	1472
5	704	3384	3728	31	132	320	328
8	224	1536	1512	34	46	1232	1232

* Transferred medium

a: Peptone added Koji-extract agar (Total N 1.47%)

b: Peptone added, NaCl 18% Koji-extract agar (Total N 1.40%)

c: NaCl 18% Koji-extract agar (Total N 0.08%)

も尚麴菌や *Rhizopus* 等の spore を多数混在し, 麴汁寒天等を用い, plate culture を行う時にはそれが旺盛に発育して yeasts の colony count の妨げとなる。糸状菌の発育阻止法については前報⁽²⁾に於て嫌気培養法及び防黴剤添加法に就て検討したが, 尙一つの方法として培地の滲透圧を高める方法が考えられる。先の [I] において醤油諸味中の酵母の生菌数測定には食塩添加の麴汁寒天を用いるべきであることを知つたが, 食塩添加によつて糸状菌の発育を阻止出来れば一層好都合であるのでこの点を吟味した。

供試菌株: *Asp. sojae* (醤油麴菌); *Asp. oryzae*; *Asp. niger*; *Rh. delemar*; *Muc. javanicus*; *Pen. chrysogenum*.

供試培地: NaCl 0, 10, 15, 18, 20% 麴汁寒天

試験法 各麴汁寒天新鮮斜面培養より 1 白金耳宛各培地に接種 plate し 30° に培養して 3 日, 7 日後に発育状況を観察した。

Table 6. Fungistatic Activities of various Concentrations of NaCl.

Strain	Cultured days	NaCl concentrations of medium				
		0%	10%	15%	18%	20%
<i>Asp. sojae</i>	3	+++	+	±	—	—
	7	+++	++	+	±	(±)
<i>Asp. oryzae</i>	3	+++	++	±	—	—
	7	+++	+++	++	±	(±)
<i>Asp. niger</i>	3	+++	+	±	—	—
	7	+++	+++	+	±	(±)
<i>Rh. delemar</i>	3	+++	+	±	—	—
	7	+++	++	+	—	—
<i>Muc. javanicus</i>	3	+++	—	—	—	—
	7	+++	—	—	—	—
<i>Pen. chrysogenum</i>	3	+++	+	—	—	—
	7	+++	+++	+	—	—

Table 7. Plate Culture of Different Aging Soy Mash using NaCl 18% Koji-extract Agar (7 days)

Microorganisms	Age of soy mash				
	8 days	15 days	30 days	45 days	180 days
Molds	+	—	—	—	—
Yeasts	+	+	+	+	+
Bacteria	—	—	—	—	—

れる。それで, 仕込後経過日数を異にする諸味に就て試験を行つた。

供試諸味: 仕込後 8, 15, 30, 45, 180 日経過諸味(10月に採取)

試験法: 各諸味を NaCl 18% 殺菌水にて稀釈し, NaCl 18% 麴汁寒天に 1 定量宛接種 plate し 30° に培養す (Table 7)。

仕込後 8 日間程度の熟成期間の極く初期の諸味は尚麴菌の発育を認めるが, 1 ヶ月を経過したものでは発育を

間前培養した酵母を NaCl 18% 殺菌水に稀釈した点を異にする。

この結果より, a, b, c 各培地にて b, c に比し a における colony 数は少いが, b, c 間に差を認め難く NaCl 濃度のみを同濃度にすれば窒素濃度には関係がないようである。

[IV] 食塩による糸状菌の

発育阻止効果 醤油諸味は仕込後相当日数を経過したもので

Rhi. delemar, *Muc. javanicus*, *Pen. chrysogenum* は NaCl 18% にて完全に発育を阻止し得るが, *Aspergillus* 属は NaCl に対する耐性強く, NaCl 18% 麴汁寒天上 3 日間の培養では全く発育を見ないが 7 日後には薄く表面に発育を認め, 20% でも尙点状に微かに発育を見る。

[V] 諸味に就ての試験

麴汁寒天上では醤油麴菌の発育は NaCl 18~20% の濃度をもつてしても尙完全には阻止し得ないが, 実際には諸味中の麴菌の spore は仕込後次第に発芽率を低下しているものと考えら

認めず、一方 yeast は何れの場合もよく colony の発育を認めた。発育した colony を検鏡した結果は yeasts のみで bacteria は認めなかつた。更にこの点を確認するために Eurocidin 0.002% 添加, NaCl 18% 麴汁寒天を用い同一諸味を plate したが、(Eurocidin は 0.002% の濃度で mold, yeast の発育を完全に阻止するが bacteria の発育を阻止せず⁽³⁾) 全く colony を認めず、従つて bacteria は発育して来ないと思われた。

考 察

醬油諸味は出麴を Bé 19° 内外の食塩水と混合して仕込を行つたもので、仕込後 1~2 ヶ月にして溶出総窒素量は 1% 近くなり、食塩及び窒素濃度の高い点において他の醸造品の諸味と異つている。醬油醸造における製麴過程と諸味の熟成過程とは上記の 2 点においてこれ又異り、且つ前者から後者への移行段階は食塩の關係に就ては不連続的に急激に行われる。微生物の発育環境としてこれを見る場合には両過程は全く別個の環境であり、後者に発育し得る菌は所謂 “osmophilic” なものとみられるが、これらでも両過程の急激な環境変化によつて相当の影響を受けることは予想せられる処である。

諸味中の酵母生菌数測定に当つてはこれらの点に注意を払うべきことは当然であり、実験 [I] (A)・(B) の結果より osmophilic yeast にあつても食塩無添加の培地に発育したものを NaCl 18% 培地に急激に移植した場合は個々の細胞は viability をかなり減じ、NaCl 18% 培地に発育したものを NaCl 無添加の培地に移植した場合も同様に viability に打撃を受けることが明らかで、測定法の実際面から言えば麴中に発育している酵母中 osmophilic yeast の数を知ろうとして NaCl 18% 培地にて直接 plate count を行つたり又諸味中に発育している酵母の plate count に NaCl 無添加培地を用いた場合は相当に低い値が出ることになる。

SHERMAN and CAMERON⁽⁴⁾ は *E. coli* の young cells について NaCl 0% から 5% 培地に移植するか又はその逆の移植をする場合は相当著しい killing action を呈することを認め、ZIEGLER and HALVARSON⁽⁵⁾ は細菌数測定に関して “curing pickle” の如きでは NaCl 添加培地の方が高い値を示したと述べている。ETCHELLS 等⁽⁶⁾⁽⁷⁾ は pickle 漬中の微生物の試験法に就て詳細に述べているが、yeasts の試験用培地として Acidified Dextrose Agar を用いて食塩添加については考慮しておらないが plate count の立場からは尙検討を要するであろう。

要するに醬油諸味中の酵母生菌数測定に当つては食塩の点から言えば諸味中の食塩濃度と同程度の食塩添加培地を用いることが必要である。

従来醬油酵母は抗滲透圧性を有する点において酒精、ビール、葡萄酒等の酵母と異なる 1 群であるとされ、その性質は遺伝的であると考えられて来たが、実験 [I] (A) において NaCl 0% → NaCl 18% の移植にては Selection の現象が見られ、又 (B) における如く一度 NaCl 18% に前培養したものを NaCl 18% 培地に移植した場合は同じく NaCl 0% 培地に移植した場合よりも発育 colony 数が多い点より、そこには尙 adaptation の現象が起つているものと推定される。DOUDOROFF⁽⁸⁾ による *E. coli* の NaCl に対する adaptation の報告もあり、酵母の抗滲透圧性における adaptation 乃至 acclimatization に就て今後更に検討を行うつもりである。

高窒素濃度培地において酵母の発育が阻害を受けることは深井⁽⁹⁾、植村⁽¹⁰⁾ 等の認めている処であるが、そのような環境下に発育した酵母の生菌数測定と、使用培地の窒素濃度の關係に就て検討した結果は必ずしも高窒素濃度培地を用いる必要はなく、普通麴汁寒天を使用出来、諸味の場合は NaCl を添加した麴汁寒天を用いればよいことを知つた。

又 NaCl 添加培地の使用は諸味中の酵母生菌数測定に必要なだけでなく、諸味中に混在する麴菌その他の糸状菌の発育を阻止する効果もあり、NaCl 濃度は糸状菌の発育阻止の目的からは 18% 以下にすべきでない。

総 括

(1) 醬油諸味は食塩及び総窒素濃度が高い点において他の醸造品諸味と異つているが、その場合の酵母の生菌数測定について検討を行つた。

(2) 食塩の高濃度の環境下に発育している酵母を食塩無添加の培地に移植する時には個々の細胞の viability を減ずるので、その場合は食塩添加培地を用いる必要がある。尙食塩 18% 濃度にては醬油諸味中に混在し酵母の生菌数測定に妨げとなる麴菌その他の糸状菌の発育を阻止することが出来好都合である。窒素濃度の關係については諸味と同様の高窒素濃度の培地を用いる必要はなく普通麴汁寒天等で充分である。

(3) 醬油酵母は抗滲透圧性を有する点において酒精、ビール、葡萄酒等の酵母と異なる 1 群であり、その性質

は従来遺伝的のものと考えられて来たが、個々の細胞に就ての観察の結果そこには尙 Adaptation 乃至 Acclimatization の過程の存することを推定した。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を賜つた恩師坂口謹一郎先生、朝井勇宣先生、住木諭介先生に深甚なる謝意を表するものである。又当所長茂木正利博士よりは種々御助言、御鞭撻を頂き、東大松山晃氏よりは御討議を頂き同室の坂口健二氏には色々とお世話になり茲に厚く感謝する次第である。

(本報の要旨は昭和29年1月30日、日本農芸化学会関東支部講演会において発表した)

(1) GRAY, W. D. : <i>J. Bact.</i> , 49, 445 (1945).	<i>J. Pub. Health</i> , 36, 1112 (1946).
(2) 大西 博 : 農化, 28, 134 (1954).	(7) ETCHELLES, J. L. and OBMER H. B. : <i>Fruit Product J.</i> 20, 334 (1941).
(3) 坂口健二 : 日農化会関東支部講演会講演, (1953 年 10 月 24 日).	(8) DOUDOROFF, M. : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 23, 585 (1940).
(4) SHERMAN, J. M. and CAMERON, G. M. : <i>J. Bact.</i> , 27, 371 (1934).	(9) 深井冬史, 入江新六, 石黒和夫 : 日醸協誌, 47, 214 (1952).
(5) ZIEGLER, N. R. and HALVORSON, H. O. : <i>J. Bact.</i> , 29, 609 (1935).	(10) 山田一彌, 古坂澄石, 植村定治郎 : 醤油と技術, 48 号 (1953).
(6) ETCHELLES, J. L. and JONES I. D. <i>Am.</i>	

Summary

(1) The author studied on the methods for determining viable counts of yeasts in soy sauce mash, which differed significantly from other brewage mashes in its high contents of sodium chloride (about 18%) and high nitrogen concentration (total N 1.0~1.5%).

(2) It was found that in the viable count of yeast cells grown in the soy sauce mash a remarkable fall was observed when ordinary media without sodium chloride were used for the plating, while any significant fall could not be observed when the media added with sodium chloride for the same concentrations as the mash were used. The use of the media with the high content of sodium chloride for the counting prevents the development of molds contained in the mash and thus made the counting of the yeast colonies easier. It was also found that the media with lower concentrations of nitrogenous matters, when used as the plating media, did not cause any all of the viable count of the yeast cells present in the mash. Since the osmophilic property of the soy yeasts against sodium chloride could be increased by the repeated cultures upon sodium chloride containing media, the author regarded it as an adaptive nature, to a certain extent, although the property had been hitherto believed to be genetically constant and transmissible.

液麴による醤油醸造に関する研究 (第1報)

I. 糸状菌の液内培養による Protease 生産に就て (i)

入 江 利 夫 (九州大学農学部資源微生物学研究室;
日本調味料醸造株式会社古賀工場)

昭和 29 年 3 月 28 日 受 理

Studies on the Soy Brewing by Enzymes obtained by Submerged Culture of Molds.

Part 1. (I) On the Protease Production under Shaking Culture of Molds. (i)

By Toshio IRIE (Lab. of Zymology and Industrial Fermentation, Fac. of Agriculture, Kyushu Univ.; Nihon Chōmiryo Brewing Co., Ltd., Koga Factory)

緒 言

かび工業の機械化は近年急速な発展を見せてをり、之に関する朝井の説⁽¹⁾⁽²⁾にもある如く旧来の醤油醸造に於ても一応検討されるべき課題となつて来た。筆者も醤油醸造に於て、製麴人件費の節減、原料利用率の向上、醸造期間の短縮、諸味調熟の科学的管理の達成等を図るべく、強力な麴菌酵素を機械化された製麴法に依り無菌的に得ることを目的とした液体麴の研究並びに之の醤油速醸への応用に関する実験を行つた。