ができた。

2. アルデハイドとして vanillin の外に syringaldehyde, *p*-hydroxybenzaldehyde が得られた。
3. アルデハイドを吸収スペクトル法で定量した所茎と葉柄部では得られるアルデハイドの種類は同じであるが、各含量は異つている。
4. 三つのアルデハイドのモル比は茎部では *p*-hydroxybenzaldehyde : syringaldehyde : vanillin が 1 : 4 : 4 であり葉柄部では 1 : 1 : 4 である。

終りに臨み当研究に種種御指導戴き発表を許可された加藤多計夫所長に感謝の意を表します。又元素分析は東大農芸化学分析室でして戴いた。

(1) TOMLINSON, G. H., HIBBERT, H. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 58, 345 (1936) ; 59, FREUDENBERG, K., LAUTSCH, W., ENGLER, K. <i>Ber.</i>, 73, 167 (1940) ; PEARL, I. A. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 64, 1429 (1942) ; 68, 916 (1946) ; CREIGHTON, R. H. J., HIBBERT, H. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 63, 3049 (1941) ; BEUGET LEOPORD : <i>C. A.</i>, 46, 7763 e (1952) ; 岩垂, 日化, 62, 1035 (1941) ; 松前, 石川, 原, 北浦 : 九州大学生産科学研究所報告, 3, 17 (1951) ; 館, 浦野 : 日農化, 27, 62 (1953).	(2) CREIGHTON, R. H. J., GIBBS, R. D., and HIBBERT, H. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 66, 32 (1944) ; CREIGHTON, R. H. J., and HIBBERT, H. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 66, 37 (1951). (3) J. E. STONE, M. J. BLUNDELL : <i>Anal. Chem.</i>, 23, 771 (1951). (4) LEMON, H. W. : <i>Anal. Chem.</i>, 19, 346 (1947). (5) D. E. BLAND : <i>Nature</i>, 164, 1093 (1949). (6) 藤田 : 専売公社中央研究所研究資料, 53号, (1951) 51頁.

Summary

The authors made a experiment on the oxidation of lignin contained in tobacco stalk and stem (*N. T. var. Virginica f. Daruma*) in an alkali medium with nitrobenzene. Results obtained were as follows ;

- (1) The results of the determination of lignin were shown in Table 1. The yield of aldehyde from 100.0 g of the stalks was 4.411 g. and 0.452 g from 100.0 g of the stems when 10 % sodium hydroxide and 60 cc of nitrobenzene were used at 160° for 3 hrs.
- (2) Vanillin was obtained from the stalks in 0.4 % yield.
- (3) The oxidation of tobacco stalk and stem lignin gave a mixture of vanillin, syringaldehyde and *p*-hydroxybenzaldehyde. Adsorption spectra method using Beckmann spectrophotometer was used for the determination. The ratio of *p*-hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde and vanillin obtained from the stalks was 1 : 4 : 4, whereas the ratio obtained from stems was 1 : 1 : 4.

醤油細菌の活動に関する研究 (第1報)

微生物、酵母と混在する細菌の生菌数測定法

坂 口 健 二 (野田産業科学研究所)

昭和 29 年 6 月 25 日 受理

The Activities of Bacteria in the Soya-Sauce Fermentation. Part 1. A Method of Viable Counts of Bacteria from the Culture mixed with Molds and Yeasts.

By Kenji SAKAGUCHI (Noda Industrial and Scientific Research Laboratory)

醤油細菌に関しては、松本博士⁽¹⁾⁽²⁾、石丸博士⁽³⁾⁽⁴⁾の研究があり、共に醤油醗中より多くの細菌を分離され、その性状を明らかにされ、その醤油醗造に於ける意義を考究された。著者は特に、1年間に渉る醤油諸味醗酵中に、細菌が時期的にいかなる消長を示すか、またいかなる生産物、酵素を産み出すか、などについて調べ、細菌が醤油醗造にいかなる役割を演じているかについて研究を進めるつもりである。

先ず醗中の細菌の今迄に分離され難かつたものを分離し、且つ細菌の概数を測定する為に Plate Count に

よる細菌数の測定を志したが、この際に最も障害となるのは、極めて多く醗中に混在する *Asp. sojae*, *Rhizopus* sp. 等の spore や酵母の為に plate の表面が掩われて、細菌の成育が抑制される事である。この為に、細菌を抑えず、黴、酵母のみを抑える抗黴物質を培地中に加えて plate culture を行う事を考案した。

即ち、合成抗黴物質としては、Na-propionate⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾, DHA⁽⁸⁾⁽⁹⁾, ascorbic acid を試験したが、いずれも黴を阻止する濃度では細菌の 1 部を抑えた。次に抗黴性抗生物質⁽¹⁰⁾中、Actidion⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾を調べたが、これは *Asp. sojae* を抑えるに 1 mg/cc を要し、実用的ではない。そこで千葉大腐敗研の W-2 物質⁽¹⁷⁾、伝研の Trichomycin⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾、武田酸研の Eurocidin⁽²⁰⁾ を用い満足すべき結果が得られた。就中 Eurocidin が種種の点より見てこの目的には最も適しているように思われる。

実 験 の 部

I. 各種の黴を抑える試験 方法は、10 cc ずつ試験管に分注した棒寒天 1.3% の加糖肉汁培地 pH 7.0 に spore suspension (2 白金耳/50 cc) 0.5 cc と、抗生物質 suspension を 0.25 cc 位ずつ無菌箱中で加えて plate する。但し Eurocidin は耐熱性が割合にあるので 120°, 15 分加熱したものをを用いた。黴の前培養は 3 日であり (Penicillium を除く) 30° に培養した。結果は Table 1 に示すが如く、Eurocidin 30 γ/cc, W-2,

Table 1. The Inhibition of the Growth of Molds by the Antifungal Antibiotics

	Days	Control	Eurocidin				W-2 substance			Trichomycin 500 γ/cc
			3 γ/cc	10 γ/cc	30 γ/cc	100 γ/cc	5 γ/cc	10 γ/cc	25 γ/cc	
<i>Asp. sojae</i>	3	++	++	+	—	—	++	—	—	—
	6	++	++	++	4 colonies	—	++	±	4 colonies	±
Spore ca. 1 million)	final pH	8.4			8.4	7.2	8.4		8.4	8.8
<i>Asp. Orzyae</i>	3	++	+	±	—	—	±	±	—	—
	6	++	++	±	1 colony	—	+	+	2 colonies	—
SI-4	final pH	8.3			8.4	8.4			8.4	
<i>Asp. niger</i> (腐敗研)	3	++	++	—	—	—	—	—	—	—
	6	++	++	±	—	—	—	—	—	—
<i>Rhi. delemar</i>	3	++	++	±	—	—	—	—	—	7.0
	6	++	++	±	—	1 colony	+	±	—	
<i>Rhizopus</i> sp*	3	++	++	1 colony	—	—	—	—	—	—
	6	++	++	±	1 colony	—	±	1 colony	—	—
<i>Mucor javanicus</i>	3	++	—	—	—	—	1 colony	—	—	—
	6	++	+	—	—	—	1 colony	—	—	—
<i>Pen. citrinum</i> 1131	3	+	+	—	—	—	—	—	—	7.0
	6	++	+	±	—	—	—	—	—	
<i>Pen. Chrysogenum</i> pigmentless	3	+	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	++	—	—	—	—	—	—	—	—
Yeast No. 6**	3	5.500	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	5.500	390	0	0	0	0	0	0	0
	final pH	8.0		7.6						

* A species of *Rhizopus* much contaminated in Shōyu koji.

** A species of *Pichia* isolated from fermenting salted mash of soya-sauce by H. ONISHI⁽²¹⁾ and supposed to be most resistant to antifungal agents.

25 γ/cc, Trichomycin 500 γ/cc で大体目的を達する。

但し、接種量の大きくなるにつれて抗黴物質を濃くしなくてはならない事は後に述べる。又、Eurocidin も 120°, 15 分の加熱により多少の効力の減退を示す

II. 各種の酵母を抑える試験

全く前と同様な方法で、前培養 3 日の酵母を適量、50 cc の滅菌食塩水 (0.5%) 中に入れ 5 分間振盪したものを接種して plate した。前培養は Koji water, plate した培地は加糖肉汁寒天、Eurocidin は、耐熱性のある事が未だ不明の時であつたので plate する際に water-suspension を加えた。Table 2 に示す如く、黴に比して容易に阻止し得る。原報によると Eurocidin は 5 γ/cc

~1 γ/cc, W-2 は 1 γ/cc~0.1 γ/cc, Trichomycin は 3 γ/cc 程度で抑える事になつているが、この方法ではそれより濃度の高い事が必要なのである。Colony の数は 3 枚の plate の平均である。判定は 2 weeks 後に行つた。

III. Eurocidin, W-2 substance, Trichomycin が細菌の成育を阻害しない事の試験 毒物に対する adaptation 乃至は acclimatization の能力を成るべく弱くする為に、比較的長い間前培養した細菌 (適応能力の最大は Stationary Phase の最初の頃にあると云われている⁽²⁵⁾) 適量を 50 cc の滅菌生理食塩水に入れ 5 分間激しく振盪してから plate culture にうつした。全て前と同様であり Eurocidin は加熱しないで用いた。但し *Clostridium* と *Acetobacter* は生育直後のものを接種した。*Clostridium* は thioglycollate added liver

Table 2. The Inhibition of the Growth of Yeasts by the Antifungal Antibiotics (Inspected after 2 weeks)

	Control	Eurocidin 10γ/cc		Tricho- mycin 250 γ/cc	W-2			Control	Eurocidin 10γ/cc		Tricho- mycin 250 γ/cc	W-2	
		pH7	pH5		Control	20γ/cc			pH7	pH5		Control	20γ/cc
<i>Sacch. sake</i>	328	0	0	0	574	0	<i>Z. Barkeri</i>	800	0	0			
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	1,160	0	0	0	700	0	<i>Cand. tropicalis</i> A	2,000	0	0			
<i>Sacch. Rasse</i> M	39	0	0	0			<i>Cand. tropicalis</i>	3,000	0	0			
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	904	0	0				SA						
<i>Torulopsis utilis</i>	63	0	0	0			<i>Cand. arborea</i>	1,500	0	0			
<i>T. miso</i> a*	1,880	0	0		3,300	0	<i>Mycotorula</i>	10,000	0	0			
<i>Hansenula</i>							<i>japonica</i>						
<i>anomala</i>	7,100	0	0	0	4,900	0	No. 6 (<i>Pichia</i> .)	7,900	0	0	0	1,010	0
<i>Pichia miso</i> *	8,900	0	0	0	528	0	No. 9 (<i>Sacch.</i>)	800	0	0		920	0
<i>Debaryomyces miso</i> *	496	0	0	0	2,200	0	No. 31 (<i>Zygosacch.</i>)	117	0	0		21,000	0
<i>Zygosacch. major</i>	192	0	0	0	1,300	0	No. 34 (<i>Zygosacch.</i>)	134	0	0		382	0
<i>Z. soja</i>	36	0	0		1,300	0							
<i>Z. sahsus</i>	34	0	0	0	310	0							

* Isolated from Miso (Salted Soy-bean, Cheese) by M. Mouri⁽²¹⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾** Isolated from fermenting salted mash of Soya-Sauce by H. Onishi⁽²¹⁾

extract agar を二重皿に入れて嫌気培養した。

細菌は一般にあまり影響を受けないようで、Eurocidin 1 mg/cc でも、*Micrococcus luteus*, *Bacillus butyricus* は阻害を認められない (Table 11)。W-2 物質では、*Bac. butyricus* に多少阻害を認め得るようである。*Bac. butyricus* は試験した菌の中で最も耐性の弱いように思われる菌である。

Table 3. The Effect of the Antifungal Antibiotics on the Growth of Bacteria

	Subcul- ture days	Eurocidin			W-2 substance		Subcul- ture days	Eurocidin			W-2 substance	
		control	100γ/cc	30γ/cc	control	25γ/cc		control	100γ/cc	30γ/cc	control	25γ/cc
<i>Lact. wortmannii</i>	15	1,600	1,510		830	732	<i>Bac. mycoides</i> †	20	75	72	980	1,000
<i>Lact. cucumeris</i> †	30	126	132		755	752	<i>Bac. polymixa</i> †	50	64	55		
<i>Leuc. mesenteroides</i> P-60	15	1,900	1,890				<i>Bac. butyricus</i> †	19	743	567*	757	120 119
<i>Leuc. mesent. dextran</i> †	40	151	149				<i>Bac. pumilus</i> †	15	286	250	256	
<i>Streptoc. faecalis</i> R†	40	554	551		53	49	<i>Clostridium sporogenes</i>	5	284	220	270	284 249
<i>Acetobacter aceti</i> †	11	150	126		3,660	3,840	Bacteria formerly isolated from the Fermenting Salted Mash of Soya-Sauce (1)(3)					
<i>Aceto. suboxydans</i> †	30	362	345		362	336	<i>Bac. mesentericus vulgatus</i> 1	13	27	25	314	316
<i>Aceto. xylinum</i> †	61	985	994				<i>Bac. mesent. vulgatus</i> 2	24	317	288	317	285
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	15	283	255		466	484	<i>Bac. mesent. niger</i>	24	117	128	117	114
<i>Micrococcus luteus</i>	15	526	587		290	286	<i>Bac. nondiast-atiacus</i> 1 †	24	154	154	154	148
<i>Achromobacter liquidum</i> †	15	128	145		503	390*	<i>Bac. nondiast-atiacus</i> 2	15	47	37	66	64
<i>Achromobacter A</i> †	11	71	71				<i>Bac. alcaligenes</i> †	30	97	113		
<i>Achromobacter UH₃</i> †	6	2,160	2,230				<i>Bac. citreus</i> α	24	234	246	234	215
<i>Escherichia coli</i>	15	1,760	1,610		1,110	1,170	<i>Bac. citreus</i> β †	30	1,340	1,400	81	74
<i>Serratia marcescens</i>	15	1,250	1,170		518	536	<i>Bac. mycoides</i>		146	141	146	122
<i>Proteus vulgaris</i>	17	1,400	1,300		1,240	1,010	<i>Bac. panis</i> †	20	272	270	19	18
<i>Bacterium succinicum</i>	20	3,080	2,940		2,900	2,940	<i>Micrococcus aurantiacus</i>	30	48	52	56	59
<i>Bacillus megatherium</i>	10	340	344		340	152**	<i>M. flavas tarcigradus</i>	20	1,240	1,200	1,210	1,300
<i>Bac. cereus</i> †	19	83	88				<i>Pediococcus</i> sp.	6	945	668*	816	945 890
							<i>Bac. subtilis</i>	24	998	916	998	900

† : Eurocidin was added before the media are heated for 15 min. at 100°.

* Presumed to be different by t-test. As Poisson distribution is fitted⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾, variance (σ^2) is equal to mean (m), and in the case of larger mean value (larger than 20), Normal distribution is well fitted⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. 5% level of significance.

** The same. 1% level of significance.

IV. Plate 上の Colony 数の分布が Poisson 分布をなす事の検定 理論上、又実際にも POISSON 分布をなす事はよく知られている⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾ ので、POISSON 分布に従う事が検定できれば行つた手技、方法に欠陥のあまりなかつた事が推定できる。そこで 3 plates を 1 組としてその 108 組について χ^2 検定を行つた。即ち、

POISSON 分布の時は $\chi^2 = S(x - \bar{x})^2 / m$ と仮定できるから、それにより χ^2 を計算した。その結果は Table 4 に示す如くよく期待値と一致する。又全体の変動の水準が予期された POISSON 分布に従うかどうかについても有意の差は認められない。即ち、 n の大きな値に対しては χ の分布が近似的に正規型となるから⁽²⁵⁾、

$$S(n) = 2 \times 108 = 216 \quad \sqrt{2n-1} = \sqrt{431} = 20.76 \quad S(\chi^2) = 233.85 \quad \sqrt{2\chi^2} = \sqrt{467.71} = 21.63$$

$$\sqrt{2\chi^2} - \sqrt{2n-1} = 0.87 < 1.645(5\%)$$

Table 4. The Goodness of Fit to POISSON

Distribution	Expected Frequency	Observed Frequency	Exp. Freq. $\times 0.43$
$\chi^2(f=2)$			
0	1.08	0	0.46
0.0201	1.62	3	0.70
0.0506	2.70	4	1.16
0.1026	5.40	5	2.32
0.2107	16.20	21	6.97
0.5754	27.00	20	11.61
1.3863	27.00	23	11.61
2.7726	16.20	16	6.97
4.6025	5.40	7	2.32
5.9915	2.70	3	1.16
7.3778	1.62	4	0.70
9.2103	1.08	2	0.46
Total	108.	108	46.44

V. Trichomycin⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ の細菌に対する効果

Trichomycin は、濃度が高くなるとは *Asp. sojae* を抑えず多くを test できなかったが Table 5 に示す通りである。大体 Actidion と同程度かと思われる。

Table 5. The Effect of Trichomycin on the Growth of the Bacteria

	control	Trichomycin 500 γ /cc
<i>Acetobacter aceti</i>	26	27
<i>Streptococcus faecalis</i>	156	162
<i>Micrococcus luteus</i>	454	438
<i>Bacillus butyricus</i>	98	82
<i>Bac. mesent. vulgaris</i> 1	26	28
<i>Bac. subtilis</i> MATUMOTO	140	123

VI. pH による効力の変化 一般に殺菌剤の多

くは pH により著しくその効力を異にする事が多いので⁽⁹⁾、pH を 8.8~3.4 の間に变化させた加糖肉汁寒天で、*Asp. sojae* と、最も耐性強い yeast と思われる yeast No. 6⁽²¹⁾ と、Bacteria 中では割合に sensitive ではないかと思われる *Bacillus mycoides* を使つて抗菌力の変化を見た。Table 6 に示すが如くであり、Eurocidin は pH 8~5 の間に多少効力が減少するかと思われるが大體安定であり、W-2 substance は酸性側で効力減退し、アルカリ側では効力が多少増大するかに思われる。Eurocidin は plate culture の際加熱せずに加えた。

Table 6. The Effect of pH on Antimicrobial Activities of the Antifungal Antibiotics

		9	8.8	8.4	8	7.4	7.2	7	6.5	5.8	5	4.8	4	3.8	3.4	3
<i>Asp. sojae</i> (after 6 days)	Initial pH					8.8	8.4	7.4	7.2	5.8	4.8	3.8	3.4			
	control					+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	final pH					9.0	9.0	8.6	8.6	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	
	Eurocidin 30 γ /cc					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 γ /cc					-	-	1	±	±	±	±	-	-	-	-
	W-2 25 γ /cc					-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++
Yeast No. 6 (after 15 days)	control					4.900	8.000	7.200	6.700	6.700	5.100	6.800	7.500			
	final pH					8.4	8.0	7.6	7.6	6.2	5.4	3.6	3.6			
	Eurocidin 30 γ /cc					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 γ /cc					0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bac. mycoides</i> (after 3 days)	control					49	330	1.000	1.000	340	290	0	0			
	final pH					7.2	7.4	8.2	8.2	8.2	7.8	0	0			
	Eurocidin 30 γ /cc					140	390	1.100	860	500	340	0	0			
	final pH					7.2	7.4	8.2	8.2	8.2	7.8	0	0			
	Eurocidin 10 γ /cc					55	340	1.000	1.000	460	330	0	0			
	final pH					7.4	7.4	8.2	8.2	8.2	7.8	0	0			
pH incubated without inoculation						8.2	8.2	7.4	7.0	6.0	5.2	4.0	3.4			

VII. *Asp. sojae* の Spore の Inoculum size による見掛け上の効力変化 Eurocidin は接種量が多くすると見掛け上効力減退を示す。即ち多量の spore 中から少量の bacteria を探す時には、Eurocidin の濃度を高くしなくてはならない。Table 7 に示す。発芽生育した spore の数は接種した spore の数の比よりも大になる傾向を示す。又、CZAPPEK agar を用いたので、効力が落ちている。

Table 7. The Apparent Decrease of the Inhibition Effect of Eurocidin by the Large Inoculation of *Asp. sojae* Spore

Number of Spores Inoculated	Days	Eurocidin		
		10 γ /cc	30 γ /cc	100 γ /cc
0.8 Million	7	80	4	0
	15	100	4	0
3.2	7	310	13	4
	15	+	13	5
13.0	7	Ca. 1,000 ?	220	33
	15	+	220	35

The table shows the numbers of colonies grown on the plate.
Eurocidin was heated in CZAPEK's medium for 20 min. at 100°.

Table 8. The Degradation of Fungistatic Activity of Eurocidin Medium by Heating.

	pH	Eurocidin				
		7 γ /cc	10 γ /cc	20 γ /cc	30 γ /cc	50 γ /cc
No heating	7.0	15	2	1	0	0
	4.8	40	2	0	0	0
100° 15 min.	7.0	11	3	1	0	0
	4.8	1,000	200	2	0	0
115° 10 min.	7.0	1,000	100	1	0	0
120° 15 min.	7.0	1,000	300	2	0	0
120° 30 min.	7.0	1,000?	+	+	74	2

About 1 million spores of *Asp. sojae* were inoculated. The table shows the colony numbers after 7 days.

Table 9. The Degradation of Fungistatic Activity of Eurocidin Medium by Preservation

Preservation days	pH	Eurocidin					
		Control	10 γ /cc	20 γ /cc	30 γ /cc	50 γ /cc	100 γ /cc
54	7.0	+	+	+	+	45	4
	4.8	+	+	+	+	200	
21	7.0	+	3		3		0
	8	7.0	+	20	0		
3	7.0	+	11	1	0	0	
	4.8	+	800	6	0	0	

About 1 million spores of *Asp. sojae* was inoculated.

Table 10. The Change of Eurocidin Activity by Media

Days	Media	Eurocidin				
		Control	10 γ /cc	30 γ /cc	50 γ /cc	100 γ /cc
2	Glucose-broth	+	10	0	0	0
	CZAPEK	±	3	0	0	0
3	G-b	+	21	0.4	0	0
	Cz	+	24	2	0	0
6	G-b	+	23	1	0.8	0.8
	Cz	+	31	7	5	3
9	G-b	+		1.4	1.4	1.0
	Cz	+		10.	3	4

About 2 millions of *Asp. sojae* spores was inoculated

に加えてはならない。Table 10 に示す。

XI. Bacteria の培養日数による Eurocidin 耐性の減退 一般に阻害剤に対する耐性は、培養が古く生活力が微弱になる程低くなるようであるが⁽²⁵⁾、多少なりとも Eurocidin によつて阻害を受けるのではないかと疑われた *Bac. butyricus*, *Bac. megatherium*, *Bac. cereus*, *Bac. mycoides* について Table 11 の如く調べたが、t-検定による有意差は見出し得なかつた。4 Plates の平均値である。なお plate culture の際には、寒天の濃度をなるべく稀くして（棒寒天で 1.3%）40° 位で接種しないと colony 数が減る。又、Eurocidin は 0.3 mg/cc, 1 mg/cc の高濃度でも、最も弱いと思われる Bacteria にも影響のない事が示されている。

VIII. Eurocidin の加熱による分解

Eurocidin は熱に對してかなり強いが、やはり効力を漸減するので試験を行った。実際に Eurocidin 培地を作るには、予じめ加圧殺菌した培地に、pH 1 の水にとかした Eurocidin を加え、試験管に分注し、100°, 15分熱し直ちに水中に漬けて冷すのが適当かと思われる。尙この加熱試験は加圧の時は5分で所定の圧力に達し加圧を所定時間行い、3分で釜から出して直ちに水で冷却した。*Asp. sojae* の spore の接種量は ca. 1 million である。Table 8 に示す。pH は中性で加熱するのが最も不活性化が少いようである。培地は glucose-broth agar.

IX. Eurocidin 培地の貯蔵

による効力減退 Glucose-broth agar の Eurocidin 培地を常温に放置しておいた所効力の減退を示した。Table 9 に示す如く pH 7 の場合には 10 日位は減退はないものと思つてよいようである。pH 4.8 では多少分解が速い。

X. Eurocidin の効力の培

地による変化 *Asp. sojae* の spore について CZAPEK agar pH 7.0 と glucose-broth agar pH 7.0 とを比較すると、CZAPEK の方が Eurocidin を多量

要 約

1. 醬油醗より細菌を分離する為、抗微生物質を培地中に加えて plate する方法を見出した。

Table 11. The Effect of Long Subculture of Bacteria to Eurocidin

	Subculture days	Control	10 γ /cc	30 γ /cc	100 γ /cc	300 γ /cc	1mg/cc
<i>Bac. butyricus</i>	3	2.740	2.660	2.820	2.620		
	20	743	783	757	567*		
	26	61	66	65	75	77	62
	61	137	150	122	108		
<i>Bac. megatherium</i>	3	148	135	121	135		
	13	125	104	114	122		
	20	267	253	253	229*		
	61	75	60	69	69		
<i>Bac. mycoides</i>	3	658	690	678	635		
	61	205	199	211	198		
<i>Bac. cereus</i>	3	135	151	147	146		
	61	41	39	42	45		
<i>Mic. luteus</i>	16	3.200				3.460	3.390

2. Eurocidin, W-2 substance, Trichomycin 共 Bacteria は殆ど抑える事なく, yeast は完全に抑え, molds も Eurocidin 30~100 γ /cc, W-2 25 γ /cc, Trichomycin 500 γ /cc で阻止する. Bacteria の viable counts は変らない.

3. Eurocidin 培地を作るには, Eurocidin を pH 1 の水にとかして殺菌した培地に加え, 試験管に分注し, 100°, 15

分の加熱を行うのが適当かと思われる. 1 週間の貯蔵に耐える.

4. *Asp. sojae* の spore を多量に接種すると, これを阻止するには Eurocidin を濃くしなくてはならない.
5. Eurocidin は pH によりあまり効力の差がないが, W-2 substance は酸性側で効力が減る.
6. 培地により効力の変化が見られる.
7. 1mg/cc の濃度でも, *Bac. butyricus*, *Micro. luteus* に影響を与えない.

この研究は東大朝井先生の御懇篤な御指導の下に行われている. 又, 坂口先生, 住木先生, 山田先生, 野田産研所長茂木博士の御指導をも頂戴している. 抗微生物質について重要な御教示を与えられ, 貴重な試料を分与された腐敗研所長相磯教授, 伝研細谷教授, 武田醸研所長佐藤博士, 中沢氏に衷心より感謝する. 標準菌は醸試松本博士, 松山大石丸博士, 武田醸研, 東大坂口研, 朝井研より頂戴した. 又終始御厚情を以てこの研究を見守られ御指導を与えられた茂木和三郎氏, 野田産研・試験所の諸氏, 又御鞭撻と御助力を与えられた同室の大西氏に深く感謝する.

- (1) 松本憲次: 醸協誌, 21, (1926); 22(1927); 23 (1928); 24 (1929).
- (2) 松本憲次: 醸試報, 99, 1 (1928); 104, 193 (1929); 129, 218, 245 (1940).
- (3) 石丸義夫: 農化, 9, 859, 953, 1143 (1933).
- (4) 石丸義夫: 醸学誌, 11, 439, 576, 689, 778, 882, 986, 1076 (1930).
- (5) 大西 博: 農化, 28, 134 (1954).
- (6) HERTZ, M. R., and LEVINE, M., *Food Research*, 7, 430 (1942).
- (7) MRAK, E. M., and PHAFF, H. J., : *Ann. Rev. Microbiol.*, 2, 14 (1948).
- (8) 長沢俊三, 川上行蔵: 農化, 25, 349 (1952).
- (9) 芝崎 勲, 照井堯造: 醸工, 31, 240 (1953).
- (10) 池田庸之助, 安藤忠彦: 醸協誌, 16, 150 (1952).
- (11) GREEN, S. R., and GRAY, P. P., : *Arch. Biochem. Bioph.*, 32, 59 (1951).
- (12) WHIFFEN, A. J., et al: *J. A. C. S.*, 69, 474 (1948).
- (13) WHIFFEN, A. J., et al: *J. Bact.*, 52, 610 (1946); 56, 283 (1948).
- (14) 相磯和嘉 他: *J. of Antibiotics*, V-3, 166 (1952).
- (15) 児玉太満三 他: *J. of Antibiotics*, V-9, 504, (1952).
- (16) 中野 政弘, 太田 輝夫: 食研報告, 6, 183 (1952).
- (17) 相磯和嘉, 新井 正 他 第 25 回細菌学会総会 (1952) に発表.
- (18) 細谷省吾, 他: *J. of Antibiotics*, V-10, 564 (1952).
- (19) HOSOYA, S., et al: *Japan J. Exp. Med.*, 22, 505 (1952).
- (20) 中沢鴻一, 藤井繁弘: 農化, 27, 253 (1953).
- (21) 大西 博: 未発表.
- (22) 茂木正利: 農化, 14, 951, 1175, 1297 (1938).
- (23) 茂木正利: 農化, 15, 921, 1023, 1221, (1939).
- (24) 茂木正利: 農化, 18, 543, 629, 733, 940 (1942).
- (25) DOUDOROFF, M., : *J. Gen. Physiol.*, 23, 585 (1940).
- (26) 松山 晃: 農化, 27, 7 (1953).
- (27) フィッシャー; 遠藤・鍋谷訳: 研究者の為の統計的方法, p. 47 (1952).
- (28) 同書, p. 51.
- (29) 統計科学研究会: 統計数値表, p. 37 (1952).
- (30) PRESCOTT, S. C., and DUNN, C. G., : *Industrial Microbiology*, p. 670 (1949).

Summary

1. To isolate and count the bacteria in the fermenting Soya-Sauce mash (NaCl 18% nitrogen content 1.4%. The spore of *Aspergillus sojae* is inoculated to the mixture of cooked soy-bean and wheat. After the materials are covered with the mycelia they are soaked in the brine. Natural fermentation goes on for one year with the aid of contaminated yeasts and bacteria) the antifungal antibiotics added media are very useful.

2. Eurocidin 30~100 γ /ml, W-2 substance 25 γ /ml, trychomycin 500 γ /ml, added glucose-broth agar can effectively inhibit many molds and yeasts such as *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, and *Candida*, and no inhibittance is observed in the plate counting of 38 species of bacteria.

3. The Eurocidin media heated at 100°, 15 min. and kept for 8-days show no decrease of activity.

4. The activity of Eurocidin is not so affected by pH.

5. The activity of Eurocidin is affected by media, and that is more effective in the glucose-broth agar than in Czapek's agar tested with *Asp. sojae*.

6. Eurocidin 1 mg/cc media shows no inhibittance to *Bacillus butyricus*.