[農化 第 42 卷, 第 3 号, p. 152~157, 1968]

醤油諸味の熟成過程解析に関する研究 (第 1 報)

諸味中の *Pediococcus halophilus* の免疫蛍光染色

中村 清, 扇元敬司*, 須藤恒二*, 梅田勇雄

〔(財)日本醤油研究所, *農林省家畜衛生試験場〕

昭和 42 年 7 月 15 日 受 理

Studies on the Analysis of Brewing Process of Shoyu Mash Part I. Immuno Fluorescent Staining of *Pediococcus halophilus*

By Kiyoshi NAKAMURA, Keiji OGIMOTO*, Tsuneji SUDO* and Isao UMEDA

Japan Shoyu Research Institute; *National Institute of Animal Health

During the maturing process of shoyu (soy sauce) brewing, it is believed that *Pediococcus halophilus* carries out a special important part. So, to inspect its behavior in shoyu mash, we examined whether immunofluorescent staining is useful or not.

Formol vaccines were made from two strains of *Pc. halophilus* (IAM 1673 and PM-2: both are isolated from different mashes) and injected to rabbits. The serum obtained from rabbit immunized with IAM 1673 agglutinated only the homologous antigen and did not agglutinate the heterologous one, and vice versa.

The result of indirect immunofluorescent staining was the same as that of agglutination. Then the two strains are differentiated from each other serologically, and immunostaining may be applied for the examination of the behavior of *Pc. halophilus* in the shoyu mash.

The bacterial fraction low in other materials was prepared from the mash and stained immunologically. Only the diplococci were well stained and the organisms of other forms were not. But some pediococcus-like organisms were not stained. Some of the organisms identified as pediococci from some characters were not agglutinated nor stained by the both sera. This suggests that there are many serotypes among the halophilic pediococci and that it may be necessary to examine the serotypes before application of immunological techniques for the study of shoyu mash.

(Received July 15, 1967)

緒 論

醤油諸味の熟成過程に関与している主要な微生物としては枯草菌, 酵母, 乳酸菌等が挙げられるが, 諸味中に生育し, 醤油にその香気と乳酸を中心とした呈味性を与える重要な役割をはたしているものとして *Pediococcus halophilus* がある。

従来, 醤油諸味中の一般細菌について, 古くは松本⁽¹⁾, 石丸⁽²⁾の研究があり, 坂口⁽³⁾および飯塚, 山里⁽⁴⁾, 上野, 大亦⁽⁵⁾は諸味中の耐塩性乳酸菌に分類学的な検討を加え, 坂口は *Pediococcus soyae* とした。これは R. H. Mees⁽⁶⁾らの分類による *Pediococcus halophilus* と比較検討された結果 *Pediococcus soyae* は *halophilus* の変種とされた⁽⁷⁾。また, Coster, White⁽⁸⁾は *Pediococcus halophilus*

と他の *Pediococcus* について血清反応を試み, 分類学上の検討を加えている。従来, このように *Pediococcus* についての分類学的な研究はかなりなされているが, これらの諸味中での生態学的な検索はほとんどなされていない。特に, 醤油の品質にきわめて重要な影響を与えている *Pediococcus halophilus* の諸味中での動態についてはいまだ不明の点が多く, したがって諸味に該菌を添加する意義についてもかなりの論議がなされている。著者らは諸味中の該菌の動態について検索をおこなうべく, 近年, 生態系における微生物追跡法としてもちいられ始めている免疫蛍光染色⁽⁹⁾を該菌について試みたので以下報告する。

実 験 方 法

1. 免疫血清の作製

供試菌株：免疫にもちいた *Pediococcus* は東京大学応用微生物研究所から分与された *Pediococcus halophilus* IAM 1673 株および (株) 樋口松之助商店から分与された *Pediococcus halophilus* PM-2 株の 2 株である。

抗原：ブドウ糖 1%，ポリペプトン(大五栄養化学) 1%，酵母エキス (Difco) 0.4%，チオグルコール酸ナトリウム (NBC) 0.1%，リン酸第一カリ 0.5%，食塩 10% を含む液体培地 (pH 7.0) に菌を接種し，37°C，72 時間静置培養をおこなった。そのうち，遠心 (10,000 rpm, 10 分) して菌を収獲し，0.85% 食塩水で 3 回菌体を洗滌した。このようにして得た菌体を 0.3% ホルマリンで固定し，Mcfarland No. 5⁽¹⁰⁾ および No. 3 の菌濃度にしたものを抗原にもちいた。

抗血清の作製：各抗原にたいして 2 羽のウサギを用意し，耳静脈に 1.0 ml の抗原を 1 日おきに 3 回接種し，1 週間後ふたたび 3 回接種した。この操作を 3 回くり返し，最後の接種後 5 日目に全採血し，血清を無菌的に得，0.0001% になるようにマージニンをくわえ，-20°C に保存した。なお，供試したウサギについては使用前に供試抗原にたいする抗体をすでに保持しているか否かを平板凝集によってしらべ，陰性のものをもちいた。

2. 凝集反応

定量凝集反応，および平板凝集反応によった。すなわち，前者では各抗血清を順次段階希釈し，これに Mcfarland No. 5 に調整した菌液を等量加え，よく振とう後，37°C にて 2 時間反応させ，その後冷室で 1 夜放置し，翌日判定した。判定の基準として，菌体が粗大な沈殿として認められるものを強陽性 (++) とし，凝集が明瞭に認められ，振ると微細な凝塊が認め得るものを陽性 (+) とした。また，菌体だけが底にしずみ凝集が全く認められないものを陰性 (-) とし，この両者の間を凝陽性 (±) と判定した。後者は清浄なせガラス上に 50 倍希釈した免疫血清 1 滴と被検菌 (Mcfarland No. 5) 1 滴をまぜ合せ，5 分間でその反応を観察した。判定は微細な凝塊をつくり，一方，対照の食塩水では一様に濁っている場合，反応は陽性であるとし，対照と同様にあらわれた場合，陰性と判定した。

3. 免疫蛍光染色

標識抗体：抗ウサギ血清山羊抗体に Fluorescein isothiocyanate を標識し，Sephadex G-50 によるゲル

濾過およびリン酸緩衝生理食塩水に対して透析後，炭末処理したものをもちいた。

染色方法：間接法によった。すなわちスライドグラス (松浪ガラス製) 上に風乾し，火炎固定した抗原菌液に適宜希釈した抗 *Pediococcus* 血清を 1 滴のせ，リン酸緩衝生理食塩水 (P.B.S. pH 7.1) の飽和蒸気中で 37°C にて 30 分間感作させた。次に余分の血清を P.B.S. にて洗滌除去し，続いて標識抗体を同様の方法にて感作させた。後 P.B.S. にて十分洗滌後，グリセリン液 (グリセリン:P.B.S.=9:1) を用いてカバーグラスで包埋した。

観察：Reichert 製 Zetopan-Binolux 蛍光顕微鏡を用いて暗視野集光器で観察し，励起フィルター BG-12，吸収フィルター YOG によった。

4. 諸味菌区分の作製

諸味をそのまま供試することは困難であったので，他の醸造物中からの菌区分調製法⁽¹¹⁾にならい，第 1 表に示した順にしたがって諸味菌区分液を調製した。

第 1 表 諸味より細菌区分の調製法⁽¹¹⁾ 5. 諸味よりの *Pediococcus* の分離および計数

醤油仕込工場から採集した諸味をできるだけすみやかに 10% 滅菌食塩水で段階希釈して試料を作製し，平板培養した。培養にもちいた培地は抗原作製の際にもちいた培地に寒天 1.2%，eurocin 10 γ /ml，炭酸カルシウム 1% を加えたものである。通常 37°C，72 時間培養後菌集落を 10⁶~10⁷ の桁から釣菌し，組成の同じ高層寒天に穿刺して分離した。

実 験 結 果

1. 抗 *Pediococcus* 血清の凝集価および免疫染色力価の測定

作製した免疫血清について凝集反応を試みたところ，

第 2 表 抗 *Pedococcus* 血清の凝集価

抗原	血清 No.	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
PM-2	1	卅	卅	卅	+	—	—	—	—	—
	2	卅	卅	卅	卅	+	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1673	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
	4	卅	卅	卅	卅	+	±	—	—	—

1) 血清 No. 1, 2 は PM-2 で免疫. 3, 4 は 1673 で免疫. また, 血清 No. 1, 3 では菌濃度 Mcfarland No. 3, 2, 4 では Mcfarland No. 5 を使用.

2) 卅; 強陽性, +; 陽性, ±; 凝陽性, —; 1:25 以下で陰性.

第 3 表 抗 *Pedococcus* 血清の免疫染色力価

PM-2 株の染色					1673 株の染色				
抗 PM-2 血清	1:100	1:400	1:1600	1:6400	抗 PM-2 血清	1:100	1:400	1:1600	1:6400
標識抗体					標識抗体				
1:20	卅	卅	+	—	1:20	—	—	—	—
1:40	卅	卅	+	—	1:40	—	—	—	—
1:160	卅	卅	+	—	1:160	—	—	—	—
1:640	±	±	±	—	1:640	—	—	—	—
抗 1673 血清	1:100	1:400	1:1600	1:6400	抗 1673 血清	1:100	1:400	1:1600	1:6400
標識抗体					標識抗体				
1:20	—	—	—	—	1:20	卅	卅	+	—
1:40	—	—	—	—	1:40	卅	卅	+	—
1:160	—	—	—	—	1:160	卅	卅	+	—
1:640	—	—	—	—	1:640	±	±	±	—

いずれの菌も自発凝集性はみとめられず, あたえられた条件下で凝集反応が成立した. 第 2 表にその測定結果を示した. homologous の菌および抗血清間では 800 倍 (PM-2), 3200 倍 (1673) まで凝集反応は陽性であったが, heterologous 間ではいずれの場合も陰性であった. このことから, これら 2 株間での血清学的特異性はいずれもきわめてつよく, *Pedococcus* 属としての共通抗原性は微弱か, または保持しないであろうことが示唆された. また, 家兎に接種した抗原濃度と作製された抗血清の凝集価はかならずしも比例しなかった.

一方, 第 3 表に培養菌に免疫染色を実施した成績をかかげた. 染色は間接法でおこなったので, 標識抗体と抗 *Pedococcus* 血清間の染色域をしらべたところ, homologous の 2 株では標識抗体は 160 倍稀釈, 抗 *Pedococcus* 血清では 1600 倍稀釈の範囲まで陽性であった. そしてこれら株間の交叉染色関係は凝集反応の場合と全く同様で, homologous では陽性, heterologous では陰性を示し, 株特異性がつよかった.

2. 諸味細菌区分の免疫染色性

培養菌を抗原にして免疫染色をおこなったところ, いずれの株も homologous の抗血清ではきわめてよく染色されることが判明したので, 諸味中に存在している *Pedococcus* の染色を試みた. 染色標本となる諸味は, その熟成過程の如何をとわず, 仕込原料の大豆, 小麦等の破片が存在し, 諸味中の細菌の顕微鏡的観察が困難な場合がしばしばあった. そこで, 実験方法の部の第 1 表で述べたように, 諸味の細菌区分をつくり供試した. このような操作をおこなって得た細菌区分と諸味中の細菌との相関性については後報で詳述するが, 細菌区分の *Pedococcus* の免疫染色性は無処理の諸味自体のそれとほとんど同じであった. 細菌区分の作製は分画遠心法(菌区分 I)と濾過法(菌区分 II)の 2 方法でおこなったが, 前者はかなり定量的な操作として推奨し得るが, 操作が煩雑でかつ後者に比し夾雑物がなかなかなり存在した. これに対し菌区分 II は I に比較してより定性的にはなるが, 粕類が少なく検鏡が容易におこなわれた. これらの点か

写真 1 諸味細菌区分の免疫蛍光染色 (×400)

写真 2 菌体性染色菌 (×1000)

第 4 表 免疫染色による諸味菌液中の *Pediococcus* 菌の検索 (I)

工場区分	仕込み後経過月数	免疫染色性*		自家蛍光	他種菌の染色性
		抗 1673 血清	抗 PM-2 血清		
A 工場 (天然諸味)	1	<10個	1~2	黄	—
	2	1~2	1~2	黄	—
	3	<10	<10	黄	—
	4	<10	<10	黄	—
	5	1~2	30	黄	—
	6	<10	<10	黄	—
B 工場 (天然諸味)	3	>30	>30	黄	—
	4	—	30	黄	—
	5	<10	>30	黄	—
	6	30	1~2	黄	—
C 工場 (温醸諸味)	7	<30	<10	黄	—
	15日	30	<10	黄	—
	30日	<10	1~2	黄	—
	45日	<10	<10	黄	—
	60日	1~2	<10	黄	—

* 40×10 の 1 視野の菌数。

写真 3 夾膜性染色菌 (×1000)

この菌区分調製に関しては今後検討の余地があるが、*Pediococcus* の免疫染色においてはいずれの場合も大差なく良く染色された(写真 1)。菌区分 I の *Pediococcus* の検索成績を第 4 表、菌区分 II の成績を第 5 表にかかげ

第 5 表 免疫染色による諸味菌液中の *Pediococcus* 菌の検索 (II)

工場区分	試料番号	仕込み後経過月数	免疫染色性*		自家蛍光	他菌種の染色性
			抗 1673 血清による染色性	抗 PM-2 血清による染色性		
A 工場 (天然)	1	3 (3日こうじ)	個	個	黄	—
	2	3 (4日こうじ)	1~2(夾)	1~2(菌)	黄	—
B 工場 (天然)	3	1	—	1~2(菌)	黄	—
	4	2	1~2(夾)	1~2(菌)	黄	—
	5	3	<10(夾)	1~2(夾・菌)	黄	—
	6	4	—	—	黄	—
C 工場 (温醸)	7	15日	1~2(夾・菌)	1~2(菌)	黄	—
	8	45日	1~2(夾)	1~2(菌)	黄	—
	9	75日	1~2(菌)	1~2(菌)	黄	—
	10	90日	1~2(夾・菌)	1~2(菌・夾)	黄	—
D 工場 (天然)	11	1	—	—	黄	—
	12	2	1~2(菌)	1~2(菌)	黄	—
	13	3	—	1~2(菌)	黄	—

* 40×10 の 1 視野での菌数。

菌：菌体性，夾：夾膜性

た。大豆粕などの自家蛍光は免疫染色をおこなった *Pediococcus* とは明瞭に区別でき、形態上該菌とは考えられない諸味中の微生物の染色は全て陰性であった。工場区分、仕込み後の経過日数、仕込み方法などの異なる諸味について特に認められるような染色される *Pediococcus* の菌数の差異はなかった。一方、この諸味中で染色されている *Pediococcus* の形態について観察すると全く同じ形態にもかかわらず、菌体のみが明瞭に染色されている菌(写真 2)と、菌の表面と思われる外圍がぼんやりと蛍光を発している菌(写真 3)の 2 つがみとめられた。後者をタンゲ

第 6 表 単離菌株の凝集反応性と蛍光染色性の関係

諸味 番号	分 離 菌株数	抗 1673 血 清					抗 PM-2 血 清				
		諸味で の 染色性	凝集反応：螢光染色				諸味で の 染色性	凝集反応：螢光染色			
			＋：＋	＋：－	－：＋	－：－		＋：＋	＋：－	－：＋	－：－
1	40	＋	0	3	1	36	＋	0	4	2	34
2	13	＋	0	0	0	13	＋	0	0	1	12
3	2	－	0	0	0	2	＋	0	0	0	2
4	3	＋	0	0	0	3	＋	0	0	0	3
5	5	＋	0	0	0	5	＋	0	0	0	5
6	20	－	0	1	0	19	－	0	3	4	13
7	13	＋	0	4	0	9	＋	1	4	1	7
8	0	＋	－	－	－	－	＋	－	－	－	－
9	24	＋	0	2	4	18	＋	1	1	3	19
10	23	＋	1	0	0	22	＋	2	1	0	20
11	0	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
12	19	＋	1	1	0	17	＋	0	2	1	16
13	4	－	0	1	0	3	＋	0	1	0	3
計	166		2	12	5	147		4	16	12	134

写真 4 分離菌株の免疫蛍光染色 (×400)

ステン燈光の暗視野で観察すると、前者と同様の菌体が明瞭にみられた。このような染色性の差異は抗血清、試料とはとくに関連はなさそうであるが、しいていえば抗 1673 血清では後者が多く、PM-2 血清では前者が多いようであった。この染色性はどのような原因にもとづくかは現在のところ不明であるが、おそらく前者は菌体のみが明確に染色されているのであろうから、これを菌体性染色菌、また後者は菌体の表在性抗原である夾膜性抗原が特異的に反応して染色しているのであろうから、これを夾膜性染色菌とよぶことにする。

第 5 表の諸味菌区分Ⅱではこの菌体性と夾膜性を分けて検索してみた。1673 株では夾膜性が多く、PM-2 株では菌体性がほとんどであることは諸味菌区分Ⅰ(第 4 表)と同様であった。

3. 諸味から単離した菌株の凝集反応および免疫蛍光染色

以上のように、醬油乳酸菌は諸味中に広く分布するのでこれを分離し、分離菌株について平板凝集反応、免疫蛍光染色を行ない、結果を第 6 表に示した。写真 4 は分離菌株の免疫蛍光染色である。1673 株では 166 分離株中、凝集反応陽性のもの 14 株、免疫蛍光染色陽性のもの 7 株であった。PM-2 株については凝集反応陽性のもの 20 株、免疫蛍光染色陽性のもの 16 株でどちらにも染色されないもの 134 株であった。諸味菌液に対する免疫蛍光染色では明かに染色される菌が認められるにもかかわらず、単離菌株については凝集反応、免疫蛍光染色ともに陽性のものは少ない結果で得られた。

考 察

使用菌株 IAM 1673, PM-2 の 2 株が免疫染色および凝集反応で全く交叉しないので、両者は血清学的に菌株特異性が高いと考えられる。しかし諸味菌液では免疫染色される菌が明らかに認められるにもかかわらず、その諸味から分離された *Pediococcus* と推定される菌のうち、両血清と反応を示さない菌株がかなりあることは注目値する。このことは諸味中には各種の血清型の菌が共存していることを示すと考えられ、坂口も糖の発酵性の異なる 13 株の *Pediococcus halophilus* を分離している。これらの差異が血清型の差異と関連するか否かは今後検討する予定である。他方、諸味中の菌の抗原性は培養菌のそれとは異なることが考えられるが、この点は適当な

諸味を選び、投与試験を行ない検討する必要がある。免疫染色法によれば抗原性を失わないかぎり、集落形成能力を失った菌、あるいは死菌をも染め得るので、本法により *Pediococcus* の検出をはかるとき、この点を考慮に入れる必要があると考えられる。

要 約

- (1) *Pediococcus halophilus* の 2 株 IAM 1673, PM-2 について抗血清を作製し、その凝集反応を行なった。
- (2) 2 株の抗血清と標識抗体をもちいて、間接法による免疫蛍光染色をおこなった。
- (3) 供試 2 株については凝集反応、免疫蛍光染色ともに菌株特異性が高く、全く交叉反応を示さなかった。
- (4) 醤油諸味中の該菌について免疫蛍光染色が可能であり、粕等の自家蛍光とは明らかに区別できる。また、形態上他菌種と思われる菌株は全て免疫蛍光染色陰性であった。
- (5) 醤油諸味中の免疫蛍光染色陽性の菌は夾膜性と菌体性のものがあり、菌株によってその染色性が異なっていると考えられる。
- (6) 醤油諸味中より単離した形態上 *Pediococcus halophilus* と思われる菌株は、供試 2 株抗血清との凝集反応および免疫蛍光染色の結果、ともに陽性のものは非常に少なかった。このことから、醤油諸味中には 2 菌株のほかに抗原性、抗体産生性のことなる菌株の存在が考

えられる。

終りにあたり、終始御指導をたまわった東大応用微生物研究所の植村定治郎教授に衷心より感謝します。

なお本報の一部は日本農芸化学会昭和 40 年度大会で発表した。

- (1) 松本憲次：醸協誌，21, 28 (1926)；22, 25 (1927)；23, 29 (1928)；24, 23 (1929)。
- (2) 石丸義夫：農化，9, 859, 953, 1143 (1933)。
- (3) 坂口健二：Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22, 345 (1958)；23, 22 (1959)。
- (4) 山里一英，飯塚 廣：農化，33, 379, 383 (1959)。
- (5) 上野照雄，大亦正次郎：醸工，39, 360 (1901)。
- (6) R. H. Mees：On derzoekingen over de Biersarciner, Theris, Delft (1934)。
- (7) 中川 淳，北原覚雄：J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 95 (1959)。
- (8) E. Coster and M. R. White：J. Gen. Microbiol., 37, 15 (1964)。
- (9) R. C. Nairn：Fluorescent Protein Tracing, 1962, E & S. Livingston Ltd. Edinburgh and London。
- (10) D. H. Campbell, J. S. Garvey, N. E. Cremer and D. H. Sussdorf：Methods in Immunology, 1963, W. A. Benjamin, Inc. New York, p. 249。
- (11) 植村定治郎：微生物工学講座，第 2 巻，共立出版，1956，p. 160。