[農化 第 44 卷, 第 3 号, p.103~106, 1970]

醤油諸味の熟成過程の解析に関する研究 (第4報)

ガス噴射法による *Pediococcus halophilus* の分離と保存

中村 清, 中村従子, 東 量三*, 須藤恒二*, 梅田勇雄*

(日本醤油研究所, *農林省家畜衛生試験場)

昭和 43 年 9 月 27 日 受理

Studies on the Analysis of Brewing Process of Shoyu Marsh

Part IV. Isolation and Preservation of *Pediococcus halophilus* under Purified CO₂

By Kiyoshi NAKAMURA, Yoriko NAKAMURA, Ryoza AZUMA,
Tsuneji SUDO and Isao UMEDA

(Japan Shoyu Research Institute, *National Institute of Animal Health)

Isolation and counting of *Pediococcus halophilus* in shoyu mash have been usually performed with tube culture method by Sakaguchi or plate culture. The culture medium contains sodium thioglycolate, eurocidin and sodium chloride and after inoculation of sample, same medium have been overlaid.

An anaerobic tube method (Hungate⁽⁴⁾ 1950) modified by Azuma⁽³⁾, one of us, was applied for the isolation and counting of *P. halophilus* and gave good results, while the growth of coexisting bacilli and yeast were inhibited without the sodium thioglycolate and eurocidin.

The survival time of *P. halophilus* in stock culture by this method was prolonged to 12 months without transfer (by usual method, it was usually 2 months).

It was proposed that this method is to be recommended for the isolation, counting and preservation of *P. halophilus*.

(Received September 26, 1968)

緒 論

従来、醤油諸味から *Pediococcus halophilus* を分離する方法としては、坂口⁽¹⁰⁾ が計数可能としている食塩 15% 培地を用いる試験管内重層培養または平板培養法が行なわれ、生じたコロニーから高層寒天培地に穿刺純粋培養する方法などが用いられている。*Pc. halophilus* は通性嫌気性であるが、どちらかといえば嫌気的条件下でよく生育することから、分離を行なうときはチオグリコール酸ソーダを培地中に添加し、高層培養して培地中にコロニーを作らせ、さらに同一組成の培地を重層し、好気性菌の生育を抑制している。また麹菌、酵母の生育を抑制する意味でユーロシジンの添加が行なわれている^(8,10)。

また、通常の混釈平板を作製し、同一培地を重層する平板培養が行なわれている^(1,2)。このような方法でも *Pc. halophilus* の計数、分離は可能であるが、著者らはガス噴射法による嫌気性菌の培養方法を適応した。

ガス噴射法⁽³⁻⁶⁾ は広くルーメン内に生育する菌の分離および検索、ならびに新しい嫌気性菌培養法として用いられるはじめての方法である。われわれはこの方法を醤油諸味から *Pc. halophilus* の分離に応用してみた結果、ふつうの平板培養法と比較した場合に、より好気性球菌を捕捉しない点、また諸味から *Pc. halophilus* の分離能の点で良好な成績を得、さらに該菌の保存にあたって従来の穿刺培養法では 2~3 カ月間の保存が限度であるのに比較し、ガス噴射法では約 1 カ年間の室温保存が可

能であることがわかったので報告する。

実験方法

1. 菌株 前報^(1,7)において使用した *Pc. halophilus* IAM 1673, PM-2, d-1, d-2, d-3, d-4, d-5, d-6, d-7, d-8, d-9, d-10, d-11, dl-1, dl-2, X-1, X-2, X-3 である。また醤油諸味は埼玉県醤油工場のものを使用した。

2. 培地 ガス噴射法および平板培養法におけるそ

第1表 培地組成

平板および高層寒天培養培地		ガス噴射法培地 ^{*2}	
NaCl	10.0%	NaCl	10.0%
KH ₂ PO ₄	0.5%	KH ₂ PO ₄	0.5%
ペプトン (大五栄養)	1.0%	ペプトン (大五栄養)	1.0%
酵母エキス (Difco)	0.4%	酵母エキス (Difco)	0.4%
ブドウ糖	1.0%	ブドウ糖	0.5%
チオグリコール酸 ソーダ (NBC)	0.1%	レサズリン液 (0.1% 水溶液)	0.1 ml/100 ml
寒 天	1.2%	寒 天	2.0%
pH	7.0	pH	7.0
ニーロシジン ^{*1}	107/ml	15% Na ₂ CO ₃ ^{*3}	5.0 ml/100 ml
		3% HCl-Cystein ^{*3}	1.0 ml/100 ml

^{*1} 試料が諸味のとき使用。

^{*2} ^{*3} を除いて調整、寒天を溶解する。

^{*3} CO₂ を bubbling しながら添加する。

れぞれの培地組成を第1表に示した。

平板培養法の培地と比較して、ガス噴射法に用いた培地はチオグリコール酸ソーダおよびニーロシジン⁽⁸⁾はともに除いてある点が異なっている。また酸化還元指示薬として 0.1% レサズリン液、pH 緩衝剤として炭酸ソーダ、還元剤として塩酸システインを加えた。寒天濃度 2%, ブドウ糖は 0.5% に低下させてある。滅菌は培地調製後、10 ボンド、10 分で行なった。

3. ガス噴射法⁽⁸⁻⁹⁾ 東らのガス噴射法によった。使用した炭酸ガスは溶接用規格、水素ガスは工業用規格である。また卓上焼却炉、ロールチューブ作製器、石英反応管などの器具は三神工業株式会社 (横浜市) 製品を用いた。

4. 醤油諸味から *Pc. halophilus* の分離方法 醤油諸味を 10% 食塩水で適宜稀釈した諸味液を作製する。一方、試験管中の空気を除酸素した炭酸ガスでおきかえておき、それに、あらかじめ同様炭酸ガスで空気を追い出しておいた培地 8~10 ml を分注し、手早くブチルゴム栓をして後、滅菌して保存しておく。この培地を

使用前溶解して後 50~55°C に冷却しておき、これに先に作製した諸味液 0.5 ml を接種した。これをロールチューブにして 37°C, 3 日間培養した。そして寒天培地フィルムに生じたコロニーを釣菌した。

平板培養法は第1表に示した培地により常法に従って行なった。

5. *Pc. halophilus* の保存法 ガス噴射法用培地 (寒天 1.2% に変更) をネッスル試験管 (12×120 mm) に 3 ml 分注し、斜面培地および高層培地を作製しておく。これに各菌株を接種し室温に保存した。各試験管にはブチルゴム栓を施した。

実験結果

1. 醤油諸味から *Pc. halophilus* の分離

仕込み直後から、約 4 カ月間にわたる醤油諸味中の *Pc. halophilus* の生育状態をガス噴射法と平板培養法で比較観察した一例を示す。供試諸味は 5 月 25 日仕込み、天然醸造のものである。

第1図に平板培養法による *Pediococcus* の分離

第1図 平板培養による *Pediococcus* の分離

●—● コロニー数から算出した総菌数
●---● 総菌数 × $\frac{\text{Pediococcus のコロニー数}}{\text{分離コロニー数}}$

coccus の分離結果を示した。実線はコロニー計数による全菌数を表わしてある。一方、これらの平板から無作為に約 50 個のコロニーを釣菌し、同組成培地に穿刺培養し、その生育状態、顕微鏡観察によって *Pc. halophilus* と思われる菌数を求め、この分離菌数に対する割合とコロニー数から算出した *Pediococcus* 数を点線に表わした。この点線の曲線がこの諸味中の *Pediococcus* 数の推移を示すものと考えられる。

仕込み直後から 10 日目にかけて $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ とかなりの生菌数が計測されるが、これは純粋培養の観察結果から、そのほとんどが好氣的に生育する球菌、*Micrococcus* や *Staphylococcus* であった。仕込み後 15 日目から 30 日目にかけて、*Pediococcus* の繁殖が旺盛になると、そのコロニーのほとんどが *Pediococcus* で占められた。しかし 2 カ月以後 *Pediococcus* の生育が落ちてくると総菌数は該菌以外の菌の影響を受けるようになり、とくに *Staphylococcus* の占める割合が大きくなった。

第 2 図にガス噴射法における結果を示した。第 1 図と同様、全コロニー数を実線で表示し、算出 *Pediococcus* 数を点線で示してある。

仕込み直後から両者がよく一致し、該菌以外の菌にはほとんど左右されない結果であった。ガス噴射法においても *Staphylococcus* が生育してくるが、総菌数に対する

第 2 表 *Pc. halophilus* の保存試験結果*

菌 株	培養法 保存期間(日)	高層穿刺培養				炭酸ガス培養		
		60	90	180	300	90	240	360
1673		+	—	—	—	+	+	+
PM-2		+	±	—	—	+	+	+
d-1		+	—	—	—	+	+	+
d-2		+	—	—	—	+	+	+
d-10		+	±	—	—	+	+	+
d1-1		+	±	—	—	+	+	+
X-2		+	—	—	—	+	+	+

* 保存菌株から高層穿刺培地に植継ぎ 37℃ で培養した。記号は、+ : 72 時間後に十分な生育を示す菌株、± : 7 日目に生育を示す菌株、— : 10 日目に生育を示さない菌株、を示す。

その影響が平板培養法に比較して非常に少なかった。

2. *Pc. halophilus* の保存試験

高層穿刺培養およびガス噴射法による *Pc. halophilus* の保存結果は第 2 表に示した。該菌は通常の穿刺培養法による保存では 2~3 カ月で生育能がなくなるのに対し、ガス噴射法によるそれは 12 カ月経過しても、すべての菌株が生育能を有しており、前者と著しい差がみられた。一方、炭酸ガス封入の高層寒天培地における該菌の生育状態は filiform を形成し、これは通常の穿刺培養におけるのと同様であった。

考 察

諸味中の *Pediococcus* 推移は、補正後では平板法、ガス噴射法ともに同様な結果を与えることから、炭酸ガスが該菌のコロニー形成に特別な作用を有するとは考えられない。また、ガス噴射法では偏性嫌気性菌のほかに通性嫌気性菌をも捕捉する可能性があり、事実、第 2 図に示すように、ある程度の補正をする必要がある。しかしその係数はきわめて 1 に近いので、仕込後 100 日前後の諸味では補正を省略することも可能かと考えられる。また、坂口は 15% NaCl 培地で試験管内重層培養により *Pc. halophilus* の計数を行なっているが、本法によればその分離がさらに容易になるものと考えられる。したがって、醤油諸味の熟成過程に何らかの意義を有すると信じられている⁽¹⁰⁾ *Pc. halophilus* の動向の解析がより容易になるものと考えられる。

他方、一般に乳酸菌の保存継代は従来、労力を要し困難な問題であったが、本法で示したように、12 カ月にわたって生育能を失わないことは、将来これらの菌の取扱いを容易にするものと考えられる。この種の *Pc. halo-*

第 2 図 ガス噴射法による *Pediococcus* の分離

●—● コロニー数から算出した総菌数
●—● 総菌数 × $\frac{\text{Pediococcus のコロニー数}}{\text{分離コロニー数}}$

philus はルーメン内細菌, あるいは腸内細菌の一部にみられるように, 炭酸ガスを必須的に要求する⁽⁹⁾ものではないので窒素ガスとの置き代えは可能であるかもしれない。しかし他方, 炭酸ガスの存在がこの種の菌の生育を促進する可能性がある。

保存に好都合である一因として乾燥の防止などがあるが, それとともに一旦生育して *Pc. halophilus* が酸素と全く接触しない点もあげられよう。酸素がいかなる機序で該菌の生育能を失わせるかは将来の研究課題の 1 つであろう。

さらにゴム栓を付した培地は長く保存に耐えることも本法の利点の 1 つであろう。また, 生育後の斜面をルーメン細菌で実施しているように -80°C で保存すれば, さらに長期間保存が可能であることも考えられる。

要 約

(1) 炭酸ガスを用いたガス噴射法によって醤油諸味中の *Pc. halophilus* の分離を行なった。その結果, 平板法に比較してかなり分離能が改善されることがわかった。

(2) ガス噴射法によって *Pc. halophilus* の保存を行なうと, 少なくとも 12 カ月以上の室温保存が可能で

あり, その後も十分に生育能を有していることがわかった。

おわりに終始御指導賜りました東京大学応用微生物研究所植村定治郎教授に深謝いたします。また醤油諸味試料を提供いただきました深井醤油株式会社に厚く御礼申し上げます。

- (1) 中村 清, 扇元敬司, 須藤恒二, 梅田勇雄: 農化, **42**, 152 (1968).
- (2) 好井久雄: 醸協誌, **60**, 353 (1965).
- (3) 東 量三: 第 40 回日本細菌学会総会シンポジウム, 臨床細菌学よりみた無芽胞嫌気性菌抄録集, p. 20.
- (4) R. E. Hungate: *Bact. Rev.*, **14**, 1 (1950).
- (5) M. P. Bryant and I. M. Robinson: *J. Dairy Science*, **44**, 1446 (1961).
- (6) W. E. C. Moore: *J. Syst. Bact.*, **16**, 173 (1966).
- (7) 中村 清, 中村従子, 扇元敬司, 須藤恒二, 梅田勇雄: 農化, **42**, 536 (1968).
- (8) 中沢鴻一: 農化, **27**, 253 (1953); **29**, 644 (1955).
- (9) L. Pine *et al.*: *J. Gen. Microbiol.*, **15**, 428 (1956).
- (10) K. Sakaguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 438 (1959).