醤油酵母の血清学的分別

茂木恵太郎, 逆井利夫

(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

昭和 49 年 6 月 14 日 受理

Serological Classification of Soy Sauce Yeasts

By Keitaro MOGI and Toshio SAKASAI

Central Research Laboratories of Kikkoman Shoyu Co., Ltd.

Serological classification of salt-tolerant yeast from soy sauce mash was studied. *Saccharomyces rouxii* was distinguished from *Torulopsis* spp. with its specific antiserum.

Torulopsis spp. which are dominant in mature soy sauce mash were classified into A and B types by each specific antiserum. *T. nodaensis*, *T. halonitratophila* were included in A type and *T. versatilis*, *T. halophila*, *T. mannifaciens* were included in B type.

Torulopsis famata and *Candida polymorpha* which appear several times in immature soy sauce mash were identified by each specific antiserum.

Yeast flora in soy sauce mash was investigated by the above specific antisera. In vigorously fermenting soy mash, *S. rouxii* was dominant but several times *Torulopsis* spp. of A type were also coexisted. Yeast flora in immature soy sauce mash was consisted of mainly *Torulopsis* spp. The ratio of A and B type *Torulopsis* in immature mash was different in various kinds of soy sauce mash.

(Received June 14, 1974)

緒 言

醤油醸造工程中において、諸味発酵および醤油香気の生成に重要な働きをされると考えられる醤油酵母の、諸味中における活動状態を調査し、その役割を明確にするために、従来研究を進めてきた。醤油諸味中の酵母の動態検索法としては、糖の資化性の差を利用した選択培地による分別計数⁽¹⁾と、醤油酵母の菌体脂肪酸組成による分類⁽²⁾について、すでに報告した。

酵母の分類法としては、土屋らの血清学的技法⁽³⁾、Spencer らの酵母表層マンナンの NMR による解析⁽⁴⁾、Ballou らの酵母マンナンの加酢分解後の側鎖のゲル濾過パターンによる分類⁽⁵⁾が知られ、さらには駒形らの GC 含量⁽⁶⁾、山田らのユビキノンによる分類⁽⁷⁾などが報告され、菌体構成成分分析にもとづく手法が導入される傾向にある。

われわれは今回、醤油諸味から分離された酵母の血清学的手法に基づく分別法を検討したので、その結果につ

き報告する。

実 験 方 法

1. 免疫血清の作製

供試酵母：免疫に使用した酵母は、醤油諸味から分離された *Saccharomyces rouxii* NISL 3358, *Torulopsis nodaensis*, *T. versatilis*, *T. famata* 3555 の 4 株である。

抗原：グルコース 5%, カザミノ酸 0.4%, 酵母エキス 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 18%, pH 4.8 に調整した培地 100 ml を含む 300 ml 三角フラスコに、供試菌の斜面培養から 1 白金耳を接種した。30°C, 10 日間静置培養後、遠心分離により菌体を集め、10%食塩水で 3 回洗浄してから 0.3% ホルマリンで固定した。菌体は、Mcfarland No. 5 の菌濃度に希釈懸濁し抗原とした。

抗血清：家兎の耳静脈に、まず 1.0 ml の抗原（酵母懸濁液）を 1 日おきに 3 回接種し、さらに 1 週間後この

操作をくり返し, 合計9回の静脈注射を行なった. 最後の接種から1週間後に300以上の凝集価を示した場合, 全採血を行ない, 300以下のときは, さらに数回の静脈注射を行なって凝集価の増大をはかった.

2. 凝集反応

試験管凝集反応: 順次段階的に希釈した抗血清 0.5 ml と Mcfarland No. 5 に調整した菌液 0.5 ml を混合し, 攪拌後 37°C, 2時間反応させ, 冷室で1夜放置後判定した.

スライド凝集反応: スライドガラス上で, 50倍希釈した抗血清1滴と上記調整菌液1滴を混ぜ合わせ, 5時間反応させ判定した.

3. 吸収試験 5倍希釈血清 5 ml にホルマリン固定した吸収用菌体約 100 mg を加え, 37°C, 2時間吸収反応後, 冷室に1夜放置してから 5000 rpm, 10 分間遠心除菌し上澄を得た. 50 倍に希釈した血清が, 吸収に使用した菌で凝集反応を示さなくなるまで, 数回この操作をくり返した.

4. 醤油諸味中の酵母の分別 諸味より試料を採取し, 前報⁽¹⁾の方法に従って, 選択培地を用いた希釈平板培養法による分別計数を行なった. さらに, 各シャーレに発生したコロニーは, 発生集落数に応じて一部(50株)または全部をスラントに鈎菌し培養後, 因子血清を用いスライド凝集反応により分別した.

実験結果および考察

1. *Sacch.rouxii* と熟成型 *Torulopsis* 属抗血清の凝集価

Sacch.rouxii 3358, *Torulopsis nodaensis*, *Torulopsis versatilis* の3株の酵母を兎に注射して得られたそれぞれの抗血清を用いて, 醤油諸味から分離した *S.rouxii* 群と熟成型 *Torulopsis* 属菌群について, 試験管凝集反応を行なった結果を第1表に示す.

S.rouxii 抗血清は, *S.rouxii* 群とは強い凝集反応を示し, 320倍まで陽性であった. 熟成型 *Torulopsis* 属菌群に対しても, 一部弱い凝集価を示し, 若干の共通抗原の存在が考えられるが, 両者は力価に大差があった. 一般に醤油諸味中において, *S.rouxii* 群は主として発酵期に存在して旺盛なアルコール発酵を行ない⁽²⁾, 熟成型 *Torulopsis* 属菌群は発酵期から熟成期にかけて広く存在し, アルコール発酵とともに醤油様芳香成分の生成を行なう⁽³⁾もので, 両者を区別することは諸味管理上重

第1表 *Sacch.rouxii* 抗血清の凝集価

血清希 釈率	20	40	80	160	320	640	1280	3560
菌 株								
<i>S.rouxii</i> 3358	+++	++	++	++	+	—	—	—
<i>S.rouxii</i> 3355	+++	++	++	++	+	±	—	—
<i>S.rouxii</i> 3401	+++	++	++	+	+	±	—	—
<i>S.rouxii</i> 3402	+++	++	+	+	+	—	—	—
<i>Torulopsis nodaensis</i>	++	+	—	—	—	—	—	—
<i>T. halonitratophila</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. versatilis</i>	±	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. halophila</i>	±	—	—	—	—	—	—	—
<i>T. mannito-faciens</i>	±	—	—	—	—	—	—	—

第2表 *Torulopsis nodaensis* 抗血清の凝集価

血清希 釈率	20	40	80	160	320	640	1280	3560
菌 株								
<i>S.rouxii</i> 3358	++	+	+	±	±	—	—	—
<i>S.rouxii</i> 3355	++	++	+	±	—	—	—	—
<i>S.rouxii</i> 3401	++	++	+	±	—	—	—	—
<i>S.rouxii</i> 3402	++	++	+	±	—	—	—	—
<i>Torulopsis nodaensis</i>	+++	+++	+++	++	++	+	+	±
<i>T. halonitratophila</i>	+++	+++	+++	++	+	+	±	—
<i>T. versatilis</i>	++	+	+	±	±	—	—	—
<i>T. halophila</i>	++	++	+	+	±	—	—	—
<i>T. mannito-faciens</i>	+++	++	+	+	—	—	—	—

要である.

次に, 第2表, 第3表により, 熟成型 *Torulopsis* 属菌群相互の凝集反応をみると, *Torulopsis nodaensis* 抗血清は *T. nodaensis*, *T. halonitratophila* とは640倍以上の凝集価を示したが, その他の *Torulopsis* 属菌群との凝集価はやや低い. 一方, *T. versatilis* 抗血清は, *T. versatilis*, *T. halophila*, *T. mannito-faciens* とは640~320倍と比較的高い凝集価を示し, *T. nodaensis*, *T. halonitratophila* などとは160~80倍とやや低い力価を示した. 土屋ら⁽³⁾は, 酵母を血清学的に10群に分別し, *Torulopsis* 属菌はそのうち9群に散在することを明らかにし, また Spencer ら⁽⁴⁾は, マンナンの NMR 分析から耐塩性 *Torulopsis* が2群に分かれることを報告して

第 3 表 *Torulopsis versatilis* 抗血清の凝集価

血清希 釈率	20	40	80	160	320	640	1280	3560
菌 株								
<i>S. rouxii</i> 3358	++	+	—	—	—	—	—	—
<i>S. rouxii</i> 3355	±	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. rouxii</i> 3401	+	+	±	—	—	—	—	—
<i>S. rouxii</i> 3402	+	±	—	—	—	—	—	—
<i>Torulopsis nodaensis</i>	+++	++	++	+	±	—	—	—
<i>T. halonitratophila</i>	++	+	+	±	—	—	—	—
<i>T. versatilis</i>	++	++	++	+	+	+	—	—
<i>T. halophila</i>	+++	+++	++	++	++	+	±	—
<i>T. mannito-faciens</i>	++	++	++	+	+	±	—	—

いるが、われわれは第 2 表, 第 3 表に示すように、醤油諸味から分離された *Torulopsis* が血清学的に 2 群に分別され、それぞれの因子血清を調製できる可能性を認めた。

2. *S. rouxii* 因子血清の作製

第 1 表によれば、*S. rouxii* 抗血清は一部の熟成型 *Torulopsis* 属菌群と弱い凝集反応を示すので、共通抗原に対する抗体を吸収操作により除去し、*S. rouxii* 群のみと特異的に反応する因子血清を得ることを試みた。その結果、第 4 表に示すように、*S. rouxii* 抗血清に対し *T. nodaensis* 菌体で 2 回、*T. versatilis* 菌体で 1 回の吸収操作を行なうことにより、50 倍希釈血清使用のスライド凝集法で、*Torulopsis* 属菌群とは反応せず *S. rouxii*

群のみと特異的に反応する因子血清が得られた。

3. *T. nodaensis* (A タイプ) と *T. versatilis* (B タイプ) の因子血清の作製

第 2 表, 第 3 表の結果から熟成型 *Torulopsis* 属菌群は、血清学的に *T. nodaensis*, *T. halonitratophila* を含むタイプ (A タイプと呼ぶ) と、*T. versatilis*, *T. halophila*, *T. mannito-faciens* を含むタイプ (B タイプと呼ぶ) に分かれる可能性が示されたので、それぞれのタイプの因子血清の作製を試みた。*T. nodaensis* 抗血清、*T. versatilis* 抗血清をそれぞれ *T. versatilis*, *T. nodaensis* の菌体で交差吸収反応を数回くり返した結果、50 倍希釈血清使用のスライド凝集法により、A タイプのみと反応する A タイプ因子血清と、B タイプのみと反応する B タイプ因子血清が得られた (第 5 表)。

この血清学的手法による熟成型 *Torulopsis* 属菌群の A タイプ、B タイプへの二大別の結果は、Spencer ら⁽⁴⁾の、耐塩性 *Torulopsis* の NMR 分析によるグループ分けの結果と一致するが、これは 2 つの分別法が、いずれも酵母表層マンナン構造の差異を識別していることに起因すると思われる。

4. 醤油諸味中雑酵母の因子血清の作製

醤油諸味中からは、*Sacch. rouxii* 群、熟成型 *Torulopsis* 属菌群のほかに、少数ながら *Candida polymorpha*, *Torulopsis famata* などの雑酵母が分離されている。これらは主として仕込初期に存在し、糖類発酵性は示さないか、または微弱で、醤油醸造への関与は少ないが、野生株として検索する必要があるので、血清学的手法の応用を試みた。*Torulopsis famata* 3555 抗血清を、

第 4 表 *Sacch. rouxii* 抗血清の吸収試験

抗血清	菌 株 吸収菌	<i>S. rouxii</i> 3358	<i>S. rouxii</i> 3355	<i>S. rouxii</i> 3356	<i>Torulopsis nodaensis</i>	<i>T. halonitratophila</i>	<i>T. versatilis</i>	<i>T. halophila</i>	<i>T. mannito-faciens</i>
<i>Sacch. rouxii</i>	<i>Torulopsis nodaensis</i> (第 1 回)	++	+	++	+	—	+	+	±
	<i>T. versatilis</i> (第 2 回)	++	+	++	+	—	—	—	—
	<i>T. nodaensis</i> (第 3 回)	++	+	++	—	—	—	—	—

第 5 表 *Torulopsis* 抗血清の吸収試験

抗 血 清	菌 株 吸 收 菌	<i>T. nodaensis</i>	<i>T. halonitratophila</i>	<i>T. versatilis</i>	<i>T. halophila</i>	<i>T. mannito-faciens</i>
	(吸収回数)					
<i>T. nodaensis</i>	<i>T. versatilis</i> (2 回)	+	+	—	—	—
<i>T. versatilis</i>	<i>T. nodaensis</i> (3 回)	—	—	+	+	+

第6表 醤油諸味中雑酵母の因子血清

菌 種	抗血清	
	<i>Torulopsis famata</i> 3555 吸収菌 (吸収回数)	<i>Torulopsis nodaensis</i> (2回)
<i>Torulopsis famata</i> 3555	+	+
<i>T. famata</i> 3290	+	+
<i>Candida polymorpha</i>	+	+
<i>Sacch. rouxii</i> 3358	—	—
<i>S. rouxii</i> 3401	—	—
<i>T. nodaensis</i>	—	—
<i>T. halonitratophila</i>	—	—
<i>T. versatilis</i>	—	—
<i>T. halophila</i>	—	—
<i>T. mannifaciens</i>	—	—

Torulopsis nodaensis 菌体で2回吸収した因子血清を用いて、醤油酵母各菌株とスライド凝集反応を行なったが、その結果、第6表に示すとおり *Torulopsis famata*, *Candida polymorpha* と特異的に反応する因子血清が作製できた。この結果、醤油諸味中の雑酵母と有用酵母の明確な血清学的分別が可能となった。

5. 血清学的手法による醤油諸味中酵母の分布調査

前述したように、醤油酵母 *S. rouxii*, *Torulopsis* A および B タイプについて、それぞれの因子血清が得られたので、実際の醤油諸味につき、従来の方法に加えて血清学的手法を取り入れて醤油酵母の分布調査を行なった。調査諸味としては、醤油工場から採取した同一の原料配合で、仕込後の経過日数が異なる発酵期および熟成期のものを使用した。まず既法⁽¹⁾の、食塩濃度18%存在

下で、グルコースは *S. rouxii*, *Torulopsis* とともに資化できるが、マルトースは *Torulopsis* のみ資化できるといふ、両酵母の糖の資化性の差を利用した選択培地による分別計数をした。さらに発生コロニーより釣菌し培養した菌体につき、スライド凝集反応による血清学的分別法を実施したが、その結果を第7表に示す。

第7表によれば、発酵期諸味は酵母の分布状態からみて2種のタイプに分けられた。1つは、マルトース培地に比較しグルコース培地の発生コロニーが非常に多い *S. rouxii* 主体諸味であり、もう1つのタイプは、マルトース培地においてもグルコース培地の1/2から1/5の発生コロニーを示す *S. rouxii*, *Torulopsis* 共存諸味である。このような分布状態の差は、仕込条件とか諸味管理の違いなどに由来すると思われるが、今後検討する必要がある。*S. rouxii* 主体諸味のグルコース培地発生コロニーについて行なった凝集試験では、*S. rouxii* 因子血清陽性が大部分であり、血清学的にも *S. rouxii* が多いことが明らかである。それ以外に、*S. rouxii* 因子血清土で含塩寒天斜面培地において、表面皺状のコロニーが約10%存在した。この酵母は食塩存在下で産膜性を示し、醤油の白カビの原因となる *Sacch. rouxii* var. *halomembranis* と推定され、血清学的に非産膜性の *S. rouxii* とやや差異が認められたが、この産膜性 *S. rouxii* の因子血清を得るには至らなかった。発酵期諸味に存在する *Torulopsis* 属酵母群は、血清学的分別によれば A タイプが多い傾向であったが、*S. rouxii*, *Torulopsis* 共

第7表 醤油諸味中の酵母の動態調査

諸味区分 (経過月数)	選択分別 培地	選択分別培地による分別計数			血清学的手法(スライド凝集法)による分別					
		発生コロ ニ-数	G-M		釣菌株数	<i>Sacch. rouxii</i> 因子血清		<i>Torulopsis</i> 因子血清		
			<i>S. rouxii</i>	<i>Torulopsis</i>		+	-	A	B	-
A 発酵期 (2)	G	240.3	×10 ⁴ /g 227.3	×10 ⁴ /g 13.0	50	43	7⑤	0	0	50
	M	13.0			39	0	39	27	0	12③
B 発酵期 (2)	G	288.3	275.6	12.7	50	42	8⑥	0	0	50
	M	12.7			38	0	38	34	0	4③
C 発酵期 (3)	G	293.3	233.6	59.7	50	39	11			
	M	59.7			50	0	50	36	8	6④
D 発酵期 (3)	G	511.3	228.6	283.3	50	23	27			
	M	283.3			50	0	50	49	0	1
E 熟成期 (9)	G	31.3	1.0	30.3	50	0	50	31	12	7
	M	30.3			50	0	50	23	25	2
F 熟成期 (9)	G	41.7	1.4	40.3	50	0	50	50	0	0
	M	40.3			50	0	50	49	1	0

選択分別培地による平板培養は、諸味を1万倍に希釈した。Gはグルコース培地、Mはマルトース培地。選択分別培地発生コロニーは、シャーレ3枚の平均値。表中○内数字は表面皺状酵母数。

存諸味の場合には、一部Bタイプの混合がみられた。

熟成期諸味は、*Torulopsis* が主体であり、*S. rouxii* はほとんど存在しなくなるが、凝集試験の結果においても、*S. rouxii* 抗血清陽性の酵母はみられず、血清学的にも *Torulopsis* が主体であることが明らかである。熟成諸味における *Torulopsis* A, Bタイプの分布割合は、各諸味により差が認められた。

要 約

(1) 醤油諸味から分離した醤油酵母を血清学的手法により分別することを試みた。

(2) *Saccharomyces rouxii* 因子血清を調製し、この因子血清により *S. rouxii* 群と熟成型 *Torulopsis* 属菌群を分別することができた。

(3) 熟成型 *Torulopsis* 属菌群は、血清学的に因子血清により2つのグループに分別できた。*T. nodaensis*, *T. halonitratophila* はAタイプとし、*T. versatilis*, *T. halophila*, *T. mannitofaciens* はBタイプとした。

(4) 醤油諸味中の雑酵母として知られる *Candida polymorpha*, *Torulopsis famata* についても、特異的に反応する因子血清が作製でき、それぞれの因子血清により他の有用酵母と分別できた。

(5) 以上の血清学的手法により醤油諸味中の酵母の分布状態を調べた。発酵期の諸味は、*S. rouxii* が主体であるが、Aタイプの熟成型 *Torulopsis* が共存する諸

味があった。熟成期の諸味は、*Torulopsis* が大部分を占めるが、AタイプとBタイプの割合は諸味の種類により差が認められた。

本実験を行なうに当たり、種々ご懇篤なご指導ご助言を賜りました農林省家畜衛生試験場須藤恒二博士に深謝いたします。ご教示をいただいた当研究所小沢善徳博士、水沼武二博士、当社茂木孝也博士、終始ご指導ご鞭達を賜りました当研究所長横塚保博士に深く感謝いたします。

- (1) 茂木恵太郎, 茂木孝也: 農化, **42**, 466 (1968).
- (2) 茂木恵太郎, 内田金治, 茂木孝也: 農化, **46**, 657 (1972).
- (3) 土屋 毅: 真菌と真菌症, **10**, 179 (1969).
- (4) J. F. T. Spencer and P. A. J. Gorin: *Antonic van Leeuwenhoek*, **35**, 33, 361 (1969); *ibid.*, **36**, 135, 509 (1970).
- (5) T. S. Stewart and C. E. Ballou: *Biochem*, **7**, 1855 (1968); J. Kocourek and C. E. Ballou: *J. Bacteriol*, **100**, 1175 (1969).
- (6) T. Nakase and K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol*, **17**, 121, 161, 227, 259 (1971).
- (7) Y. Yamada and K. Kondo: *ibid.*, **19**, 59, 189, 353 (1973).
- (8) H. Onishi: *Advances in Food Research*, **12**, 53 (1963).
- (9) 浅尾保夫, 逆井利夫, 横塚 保: 醸工, **47**, 318 (1969).