



Title	北海道産醤油諸味酵母に関する研究
Author(s)	吉田, 忠; YOSHIDA, Tadashi
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(4), 289-347
Issue Date	1973-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11839
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(4)_p289-347.pdf



北海道産醤油諸味酵母に関する研究

吉 田 忠

(北海道大学農学部農芸化学科応用菌学講座)

Studies on yeasts of soya mashes* in Hokkaido

Tadashi YOSHIDA

(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received June 6, 1972

目 次

緒 言	289	II. 醤油諸味への適用	322
研 究 史	290	第 2 節 <i>Torulopsis etchellsii</i> の生育条件	323
第 1 章 北海道産醤油諸味酵母の		I. 温度の影響	323
種類とその分布	294	II. 栄養源の影響	324
第 1 節 酵母の分離と分類	295	第 3 節 <i>Torulopsis etchellsii</i> の分別計数	327
第 2 節 酵母の分布についての考察	301	第 4 節 要 約	328
I. 分離酵母の分布と地域について	301	第 6 章 純粋培養酵母の添加による醸造試験	328
II. 分離酵母の分布と諸味の品質について	302	第 1 節 主要酵母添加の影響	328
第 3 節 要 約	304	第 2 節 <i>Torulopsis etchellsii</i> の添加効果	330
第 2 章 食塩濃度と酵母の生育および		第 3 節 要 約	335
醗酵との関係	305	考 察	335
第 1 節 生育に対する食塩濃度の影響	305	総 括	339
第 2 節 醗酵性に対する食塩濃度の影響	308	文 献	341
第 3 節 要 約	310	Summary	345
第 3 章 <i>Torulopsis versatilis</i> の糖類醗酵性	310		
第 1 節 食塩無添加時における糖類醗酵性	310		
第 2 節 糖類醗酵性に対する塩類と			
その濃度および pH の影響	312		
第 3 節 粗酵素液によるサツカロースと			
ラフィノースの分解	315		
第 4 節 要 約	318		
第 4 章 醤油諸味酵母のフラクトース			
醗酵性と同化性	318		
第 1 節 醗酵性および同化性試験	319		
第 2 節 要 約	321		
第 5 章 <i>Saccharomyces</i> 属および <i>Torulopsis</i> 属			
酵母群の分別計数	321		
第 1 節 選択培地とその適用	321		
I. 純粋培養への適用	322		

緒 言

醤油はわが国において米、魚、蔬菜を主体とする食生活と密接な関連を保ちつつ伝承されてきた独特の調味料で、豊富な魚、肉、果実類の保存と貯蔵に対する古代人の工夫の所産と考えられる。

その醸造は基本的には、ほぼ同量の蒸煮大豆と炒煎小麦とから麴を作り、これとほぼ同量の食塩水 (18.9°Bé) とを混じて醗酵槽に仕込み、時々攪拌しながら室温において約 1 年間の醗酵、熟成を経るもので、搾汁、火入れして製品とする。この間に、麴、酵母、細菌による蛋白、澱粉、脂肪などの分解があり、その結果、アミノ酸、ペプチド、糖類、脂肪酸、アルコール、有機酸などが生産されて独特の色沢と味わい、および香りが醸成される、微生物の関与なくしては造り得ないものである。

* Soya mash is a fermentation product of the mixture of salt and koji which is made by culturing mold, *Aspergillus oryzae*, on the steamed soybean and roasted wheat. The pressed juice of this fermented mixture is called as soya sauce or shoyu and is generally used as a seasoning in Japan.

古来、良好な醤油には夏期における旺盛な「湧き」が必要だとされている。このことは醤油醸造における酵母の重要性を示唆するものであり、酵母による旺盛な主酸酵とその後の長い熟成があってはじめて優れた品質となるものと考えられる。

醤油醸造における酵母の重要性は早くから着目され研究が行なわれているが、その多くは分類と分布の検討を主としたものであり、諸味という高い食塩濃度の特殊な環境において酵母を生態的にとらえ、熟成との関連を適切に考察したものはない。

一方、北海道における醤油醸造は明治3年の開拓使設置にはじまり、同14年、民間に受継がれて今日に及んでいるが、内地製品にくらべて香味が劣るといふ漠然とした評価を受けている。この問題に関して、北海道大学農学部応用菌学講座では、微生物学的立場から品質改善の方策を得ようとしてきたが、未だその核心をつくにいたらなかった。

醤油が国民的嗜好に最も適合した調味料としてわが国の食生活に密接に結びつきながら今後も変らぬ重要性を保つことを考え、また特に近年、合成食品添加物等の害が取沙汰されるに及んで、自然食品への関心が高まりつつあることを考え、ここに北海道内における醤油醸造を、酵母の生態を通して眺め、酵母の意義を考え、有効な利用を図って品質の改善に役立てようと思い、一連の研究を行なった。この分野において幾らかでも貢献できれば幸いである。

この研究を行なうに当たり、試料収集に御協力頂いた北海道味噌醤油協同組合連合会、並びに醸造試験に便宜と御助力を頂いた福山醸造株式会社に厚く感謝の意を表す。

この研究に際し、終始御指導御鞭撻頂いた北海道大学名誉教授佐々木酉二先生、御助力頂いた同農学部高尾彰一教授、坂村貞雄教授に衷心より御礼申上げる。

研究史

醤油が科学的に研究されるようになったのは19世紀末からのことで、すでに100年近くの研究史をもつが、その内容は、初期における成分分析および微生物分類検索の時代と、第2次大戦後の著しい分析機器の発達および酵母の新分類法確立(1952)などを背景とした新しい展開の時代、の2つの山からなると見ることができる。

初期の研究は、第1次大戦の始まる大正3年(1914)頃で一段落となるが、その前半、明治33年(1900)頃までは主として醤油の化学成分分析が行なわれ、磯野氏¹⁾、

田原氏²⁾、田原、喜多尾両氏³⁾、平野氏⁴⁾、古川氏⁵⁾等は、醤油が栄養の点からも重要な調味品であることを指摘している。この中で磯野氏は、醸造期間中の諸味の成分変化が最初の10カ月間に急速に進み、その後は緩慢になる、として醸造過程の一つの型を示している。

微生物学的な研究は明治30年(1897)、西村氏⁶⁾によって始めて報告された。氏は、麴製造および諸味熟成過程における化学変化を追って基礎的な検討を行ない、醤油醸造は麴製造により澱粉分解と蛋白分解が、酵母によりアルコール醱酵がそれぞれ行なわれ、高濃度食塩により不要の細菌類の生育を妨げるもの、と結論し、諸味から得た2種の酵母を、酒酵母と *Saccharomyces exiguus* 類縁種として報じた。

これに対して斎藤氏^{7,8)}は、複雑な醱酵現象の究明には、化学的研究と同時に微生物学的検討が是非とも必要である、として、醤油酵母その他の微生物に関し詳細な研究を発表した。氏は、銚子、浜口醸造場の麴および諸味から10種のかび、5種の酵母と7種の細菌とを分離し、形態学的、生理学的性質の記載を行ない、特に主要菌についてはその生育や酵素活性と食塩濃度との関係をも検討している。

斎藤氏によると、これら微生物中主なものの一つは、原料の澱粉糖化、蛋白分解に不可欠の重要な役割を果たす *Aspergillus oryzae* で、そのインベルターゼは20%の食塩濃度にも耐えるという。また他の一つは、いわゆる醤油酵母で、新種 *Saccharomyces Soya* と名付けられ、諸味醱酵過程で大量のアルコールを生成する。この酵母は細胞中にインベルターゼをもつが、サツカロースを醱酵し得ないこと、20%の食塩溶液中で原形質分離を起すが速やかに回復すること、などの興味ある特徴を有する、と報じた。

諸味から同時に得られた酵母としては、このほかに醱酵液面に形成される“Kahmhaut”の形成菌として *Saccharomyces farinosus*、“Soya-Kahmhefe”、*Mycoderma* sp. など、いずれも産膜性の3種と、耐塩型と見られる *Torula* sp. がある。“Soya-Kahmhefe”は後年、同氏によって *Zygosaccharomyces japonicus* と命名された⁹⁾。

7種の細菌のうち、*Bacterium Soya*、*Sarcina Hamaguchiae* の2種は新種で、17%食塩液中でも生育し得る乳酸生成菌であり、他は *Bacillus subtilis* などの好気性有孢子細菌で、諸味中では孢子の形で生存する、としている。

Saccharomyces Soya のアルコール醱酵については、

西村氏¹⁰が研究し、食塩を5%内外に含む場合のグルコース醗酵は最も旺盛で、食塩濃度が高くなると醗酵力が弱められることを明らかにし、さらに醤油酵母が食塩に馴養できて高濃度でも迅速に繁殖するようになることを見出した¹¹。氏はまた全国的に数多くの醤油諸味試料を集め、11種の産膜酵母¹²、3種の非産膜酵母¹³を分離、それぞれ新種として命名した。特に産膜酵母については産膜の機構、生理などについて詳細な検討を行なっている¹⁴。

同年、満田氏¹⁵も野田、竜野、半田地方の諸味を採取し、5種の酵母について生理性を検討し、斎藤氏の酵母とは醗酵性において異なるものを含むと報告した。

喜多氏¹⁶は醤油醸造に関する一連の研究で、野田、銚子、静岡、半田、堺、小豆島、および竜野各地方で、仕込時期を異にする諸味試料から4種の酵母を分離したが、一度夏期の醗酵を通った諸味からは *Torula* に属する主要菌が共通して分離され、未醗酵の諸味からはこれと別種の酵母が得られるとし、後者は諸味醗酵に重要でないとするなど、酵母と醸造過程との関係を動的に捉えようとした。

しかし、これらはいずれも分類学的には不充分なもので、さらに系統的な研究が必要であるとの見地から、高橋、湯川両氏¹⁷⁻¹⁹は、各地の工場から熟成度の異なる52種の諸味試料を集め、分離した芽生菌について分類学的位置の検索を行ない、醤油熟成との関連性を考察し、さらに子嚢胞子の形成、発芽について詳細な検討を行なったほか、各分離菌の麹汁醗酵生産物についても分析した。分類した菌種は、*Zygosaccharomyces major*, *Z. soja*, *Z. salsus* の3新種と、*Z. japonicus*, 無胞子型 *Z. soja*, *Mycoderma* sp. *Pichia alcoholophila* var., *Torula* 2種, *Monilia* 1種など合計10種である。このうち、非産膜性の *Z. major* および *Z. soja* については、前者が熟成後期の試料に多く、後者が初期の諸味に多く見られることから、この両者が醤油熟成に重要なことを推測した。また同じく非産膜性の無胞子型 *Z. soja* は小豆島、竜野など、関西地方の諸味から多く出現しているとし、酵母の分布に興味ある点を指摘している。

一方、北海道においても既にこの時期、吉田武郎氏^{20, 21}によって醤油“生黴”の原因菌としての酵母3種が分離され、このものが成分を悪変し、香気を不良とすることを記し、山本氏²²も札幌市内醸造所の醤油諸味から非産膜酵母 *Z. soja*, 産膜酵母 *Z. japonicus* を分離し得たと報告した。

20世紀初頭におけるこれらの研究は、醤油醸造につい

ての微生物学的研究に先鞭をつけたものであり、化学的成分変化の研究と相俟って、少なくとも、その主役となる微生物、特に酵母の地位をはっきりさせたものと見ることが出来よう。

これ以後の一時期、醤油に関する興味は、一つは細菌類に、一つは醤油の特徴的な香味を如何に速やかに得るかの点に向けられ、細菌類の解析とともに速醸法の開発と香味、色の本質究明が主なテーマとなった。

蛋白分解に重要と見られる細菌類の分類と分布の研究ではすでに高橋氏²³、梶野氏²⁴⁻²⁷等の報告があり、諸味醸造に重要なことが示唆されていたが、この考えは木下氏²⁸、宮路氏²⁹、松本氏ら³⁰⁻³⁵、石丸氏³⁶、村津氏⁵⁷によってうけつがれ、細菌類の効用が強調された。

また醗酵熟成期間短縮のための加温醸造³⁸⁻⁴⁰や酵素利用による速醸法⁴¹⁻⁴⁴の研究が行なわれ、香味の改善と速醸を目的とした微生物の添加醗酵が続々と試みられた。微生物を特に添加して風味良好な品質を速やかに得ようとの試みは、伊藤氏⁴⁵による乳酸菌応用、梶野氏⁴⁶による食塩馴養細菌および酵母添加が嚆矢となり、安藤氏⁴⁷が *Aspergillus oryzae* と *Bacillus natto* による製麹醸造で良品を得たとし、松本氏ら⁴⁸⁻⁵³が乳酸菌、酵母、馬鈴薯菌を粉末剤または生菌として添加醸造し、香味優れた良品を得、熟成を早め得たことを報告した。

香味に関しては、エステル形成⁵⁴、有用菌の繁殖⁵⁵、アルデヒド形成^{56, 57}、ブチレングリコール⁵⁸などの重要性が指摘され、さらに分析法の進展とともに化学的な究明が行なわれるようになった。庄司氏⁵⁹⁻⁶³がポーラログラフィを駆使してフェノール区分を醤油香氣の主体としたほか、醤油特有の香氣としてケトンアルデヒドのソヤナール⁶⁴、アルデヒド類^{65, 66}、含硫化合物^{67, 68}、ピロニ誘導体のショユオール⁶⁹、フェノール化合物のショユフェリン⁷⁰が報告された。

石丸氏⁷¹が醤油酵母について大正14年以降10年間の研究をまとめて発表したのは1935年のことである。

氏は、高橋、湯川氏らと同様の方針で仕事を進め、ヤマサ醤油醸造場の諸味あるいは醤油から非産膜性酵母として *Z. soja* の5変種、*Z. major* の2変種、産膜酵母として *Z. japonicus* 1変種と *Torula* 属6種を得、夏を中心として気温20°C付近をこえる期間に諸味中における酵母類の活動が最も旺盛で、その数も極めて多くなること、一般に各時期を通じて *Z. soja* var. が最も多く現われ、*Z. major* var. これに次ぎ、醤油上に黴となって現われる *Z. japonicus* var., *Torula* 属などの産膜酵母も次いで多く出現することなどを示したが、さらに酵母の

醱酵性に着目し、概して産膜酵母の類は非産膜酵母に比べて醱酵力弱く、諸味中での繁殖力も劣り、著しい醱酵を営まず、諸味の醱酵化学的変化の微妙な点に因与するもの、と推測、主要酵母は20%の食塩を含む場合でもよく繁殖、醱酵するが、食塩のない場合に最もよく醱酵し、食塩が増すに従い醱酵力は弱まること、人工培養に際してはオリザニン、米麹汁の添加が有効であることを見、また、アルコール醱酵の副産物として高級アルコール、アルデヒド、琥珀酸などが生産され、これが醤油に軽快芳醇な香味を付与し、色沢を整え、糖、アミノ酸の消費により、細菌、麹菌の酵素による呈味成分の蓄積を促進する、と結んで醤油酵母の重要性を強調した。

支那事变から第2次世界大戦にかけて、国内は耐乏生活を強いられると同時に、食品関係の研究も戦時食や携帯食糧、乾燥食品の開発に向けられ、醤油の化学的、微生物学的究明は全くなされなまま終戦にいたった。

戦後の混乱期には食糧事情の悪化による多くの問題が提起されたが、醤油醸造に関しても原料の品質低下による湧き現象に端を発し、茂木氏ら⁷²⁻⁷⁶⁾による湧き酵母の発見と防湧の研究が行なわれたほか、醤油の微生物学的な究明が再び活潑となった。

北大応用菌学講座では早くから北海道産醤油の品質向上をはかるための微生物学的な研究を行なってきたが、森田氏⁷⁷⁾は北海道内数カ所の醸造場の諸味試料から酵母を分離し、醱酵の初期および後期には酵母の出現頻度が比較的少なく、主として非産膜性で糖類醱酵性の乏しい酵母および産膜性酵母が見られること、最も盛んに醱酵している期間には糖類醱酵性の旺盛な非産膜性酵母が高い頻度で現われること、天然醸造諸味、速醸諸味で同一の傾向が見られることなどを示し、特に香氣との関連性を検討して、特有の醤油類似香を有するものはほとんどが非産膜酵母であることを見ている。次いで石川氏⁷⁸⁾は、これら酵母の分類学的検索を行ない、4属9種、6変種としたが、このうち、醤油類似香をもつものとして *Torulopsis*, *Rhodotorula* などを挙げている。

佐合氏⁷⁹⁾は、寒地醸造の型式を発見することを目的として、正常な醱酵状態を微生物学的に明らかにするため、醤油諸味熟成中の各微生物群の消長を、かび、酵母、酸生成菌および蛋白分解菌の4群に分け、特に耐塩性のものについて調べた結果、醱酵中における酵母菌数の増減が諸味の熟成とある程度比例する傾向にあることを突きとめ、熟成の経過について麹菌などのかびは熟成の進行とともに徐々に死滅し、分泌された酵素が原料成分の溶出、分解に、恐らく熟成の最後まで関係すると考えられ

ること、その間に微生物各種があるいは協力的に、あるいは阻害的に複雑な条件の下で作用し、特に醤油醸造の究極の目的である香味の調熟に関しては、酵母群が第一義的に有効であること、正常な醱酵では、前半の主醱酵から後半の後醱酵に移るのが大体50~60日目と見られることなど示唆に富む結論を導いた。また若い諸味搾汁を用いて純粋分離酵母の醱酵試験を行ない、香味を比較したところ、産膜酵母はほとんどが不快臭を呈し、非産膜性で醱酵の旺盛なものにわずかに良いものが認められるが、香味といえるものはなく、試験後、放置して酸化蒸発したものにややそれに近くなるものがあった程度としており、従来、ほぼ定説とされていた主要な非産膜性の醤油酵母が香味を附与するとの考えに疑問を投げかけている。この点については矢内氏ら⁸⁰⁾も芳香性 *Z. soja* を過剰に添加して不調和に急激な醱酵を行なわせると品質が劣ってくることを示し、主醱酵酵母の利用について警告を発している。

1952年に至り、LODDER および KREGER-VANRIJ 両女史⁸¹⁾は、それまでの酵母分類を集大成した上、新たに系統的酵母分類学を確立し、その後の酵母の分類は専らこの方法に基づいて行なわれるようになった。しかしこの中で、*Zygosaccharomyces* の特徴である、2細胞の接合によって子嚢を形成するという性質は、この栄養細胞がハプロイドであるため、ディプロイドである *Saccharomyces* の一面に過ぎないとして *Zygosaccharomyces* 属を認めず、*Saccharomyces* 属に統合してしまった。このため、伝統ある *Z. soja* その他の醤油酵母は、非産膜性、産膜性を問わず、すべて *Sacharomyces rouxii* として取り扱われることになり、斎藤氏の醤油酵母 *Saccharomyces soja* もまたこの種に包含された。

LODDER 女史らの分類法にしたがって、醤油酵母を検討したものに、小原、野々村両氏⁸²⁾による溜諸味および麴から得た酵母の研究があり、*S. rouxii* のほかに *Debaryomyces tamarii*, *Pichia mogii*, *P. sake*, *P. farinosa* var. *japonia*, *Cryptococcus diffluens* var. *nonmembranaefaciens*, *Candida polymorpha*, *Trichosporon cutaneum* var. *curvatum*, いずれも新種、新変種の得られたことを報告している。

また、大西氏^{83,84)}が野田地方の醤油諸味その他から得た酵母について分類学的研究を行なった結果、耐塩性の強い酵母として *S. rouxii*, *S. rouxii* var. *halomembranis*, *S. acidifaciens*, *S. acidifaciens* var. *halomembranis*, *Torulopsis halophilus*, *T. nodansensis*, *T. famata*, *T. versatilis*, *T. etchellsii*, *T. sphaerica*, *T. sake*, *Pichia*

farinosa, *Candida polymorpha*, *Trichosporon behrendii*, 耐塩性の弱い酵母として *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *Trichosporon cutaneum* など2新種, 2変種を含む16種を報告している。

一方、醤油の生態究明の動きも活潑となり、清水氏⁸⁵、山田氏ら⁸⁷、香川県醤油試験場⁸⁸がそれぞれ醸酵力の比較、食塩と生育、醸酵との関係を検討したが、中でも山田氏らは、種々の塩濃度(0~19%)および窒素濃度で、*Z. major*の生育と醸酵能を調べ、この酵母の生育曲線は下面醸酵酵母型で、“lag phase”が長く、且つ好気的条件下での醸酵は不安定であること、醸酵能の形成は食塩によって促進されるが、その耐塩性は低く、諸味程度の食塩濃度で著しく抑制されること、窒素が高濃度になると醸酵能の形成、耐塩性が共に低下すること、*Z. major*の生育は醸酵能に依存し、食塩濃度が高くなるとともに生育も阻害されるが、その程度は生育適温付近で最も小さく、高温では特に著しく阻害される、などを示した。

さらに佐藤、植村両氏ら⁸⁹⁻⁹⁷は *Z. major*の食塩耐性の機作に言及し、食塩濃度10%の場合、この酵母の耐塩性には遺伝的形質としての面のほかに、耐塩性を賦活させる機作があって、コリン、メチオニン、イノシトールが重要な役割を演じ、少なくともこれらの一つは核酸代謝に関係するものと推論している。このうち、コリン要求性は *Torulopsis* 属酵母についても認めている⁹⁸⁻¹⁰⁰。

また今原氏ら¹⁰¹⁻¹⁰⁵は特に産膜酵母に注目して、繁殖状態と醸酵力との関係を追究し、食塩に対して馴致されると、高濃度の食塩培地での醸酵力は、皮膜を形成する細胞の方が沈澱中の細胞に比較して食塩による影響をうけ難いこと、食塩による繁殖抑制状態でも代謝様式に関する呼吸商の変化は考えられないことを明らかにし、また、好気的条件下では、非産膜性酵母によるグルコース代謝能は微弱であるが、産膜性酵母では食塩が高濃度の場合、主として皮膜にそのグルコース代謝能が認められること、*Z. salsus*は塩類、糖類を添加して表面張力を高めた培地では皮膜を形成するがTween類0.01%の添加で産膜性は抑えられること、エーテル型Emulgen 0.05%添加で非産膜性となり、これを用いて醤油を醸造すれば香りや優れたものを得る、と興味ある報告をした。

竹田氏ら¹⁰⁶もまた、上面醸酵酵母と下面醸酵酵母との性格を比較し、醸酵力は累代培養によって変化することでないこと、累代培養した場合の形態変化は上面醸酵酵母が特に塩分の影響をうけること、を見たほか、通気培養により、下面醸酵酵母の増殖には上面醸酵酵母よりも多量の酸素を必要とすることを推測し、諸味中の酵母

の生活現象から、湧付調熟の点で通気法は優れた醸造法になることを指摘している。

*S. rouxii*の醸酵性に関し、照井、佐瀬両氏¹⁰⁷は特にサッカロースの醸酵性について検討し、これが適応的であり、0.2% L-アスパラギン酸および1 $\mu\text{g/ml}$ のピオチン強化培地では、LODDERらの方法でサッカロース醸酵性が陰性であった菌株も陽性になる、との興味ある報告をしている。

また大西氏は、*S. rouxii*の生理的性質について詳細な研究を行ない、18%食塩含有培地では細胞膜透過性が增大すること¹⁰⁸、40°Cでの生育には一定濃度以上の食塩その他の塩類または糖類が必要であること¹⁰⁹、高濃度の食塩を含む培地で好気的に培養すると多量のグルセロールを生産すること¹¹⁰⁻¹¹⁴、18%の食塩を含む培地では、普通培地で認められたガラクトース、マルトースの同化性、醸酵性はほとんど認められなくなること¹¹⁵、などの特異性を明らかにした。また別に新種 *T. halonitrato-phila*を分離し、この酵母が30°Cでは偏性好塩性であるが、20°C以下では通性好塩性となる特性を見、好塩性には温度の影響も見逃さないこと¹¹⁶、微生物相の動態には、食塩濃度、pHの変化も大きな影響を与えること¹¹⁷などを指摘している。

このほか、堂本氏ら¹¹⁸による *Z. major*と *Z. soyae*およびパン酵母の呼吸に及ぼす食塩と塩化カリ(濃度各0~3M)の影響の検討があり、いずれの場合も塩濃度とともに呼吸阻害が起るが塩の種類による差はないとしている。

微生物相の動態についての報告は数少ない。

好井氏ら¹¹⁹は天然醸造諸味の微生物相について、仕込後、熟成に至るまでの動態を経時的に調査し、酵母はいずれの諸味においても気温が適当となれば増殖し、夏期には最高(10⁶ cells/g)となり、糖分の大半が急激に消費されること、細菌総数は仕込当初に減少し、その後も漸減する傾向が見られるが *Bacillus*群は全期間ほぼ一定と思われること、乳酸菌についても醸造経過とともに漸減し、醸造末期には仕込時に比べて極く少数となること、麹菌胞子は諸味中でかなり長期間生存し得ることなどを見、微生物相の変化と諸味成分の変化、品質との間に明らかな相関性を認め得なかったが、酵母の醸酵が醤油醸造上に大きな意義をもつものと推定している。

山里氏ら¹²⁰は攪拌法による醸造で微生物相の動態、有機酸組成の変動を調べ、麴に由来する耐塩性の低い擬菌糸形成酵母は、仕込後急減し、これに代っていわゆる醤油酵母が増殖するが、乳酸菌はあまり変らないとして

いる。

このほか、町女史¹²¹⁾の天然醸造と温醸諸味の微生物相の動態を比較した研究があり、適正な管理を行なえば、温醸は時間短縮と恒常的に良品を得る上で推奨出来るとしている。

醤油の品質向上、香味附与のための基礎的な研究は、分析機器の著しい発達にもなって進展したが、アミノ酸、有機酸、無機成分などはその微量をも検出定量出来るようになり、特に味覚と関連して、核酸物質¹²²⁾、グルタミン酸およびアミノ酸^{123~129)}、ペプチド類¹³⁰⁾が醸造過程での消長も含めて分析検討され、特異な多価アルコール生成も大西氏¹³¹⁾によって味覚に影響するものとして取扱われた。有機酸についても詳細なデータが得られるようになり、石塚氏¹²³⁾、原田氏¹³²⁾、黒島氏¹³³⁾、後安氏¹³⁴⁾、上田氏^{135,136,138,139)}、上野氏¹³⁷⁾、石上氏^{140,141)}、森本氏¹⁴²⁾によって、醸造法、味覚、微生物動態などと有機酸との関連性が検討された。

これら醤油成分の詳細な分析研究と相前後して、これまで主として蛋白分解作用に注目されていた醤油細菌類の研究は、乳酸菌を主とする酸生成菌に向けられるようになり、好塩性ないし耐塩性で生酸性の強い菌として、*Pediococcus acidilactici* またはその変種¹⁴³⁾、新種 *Ped. soyae*^{144~147)}、同類似菌および耐塩性の新種 *Tetracoccus soyae*^{148,149)}、*Streptococcus*¹⁵⁰⁾、耐塩性の好気性生酸菌 *Staphylococcus epidermidis*¹⁵¹⁾ などが分離、研究され、その好塩性ないし耐塩性と強い乳酸生成によって諸味のpHを低下し、主醸酵酵母の繁殖を促し、香味向上など熟成に好影響を与えることが示唆された。

これと平行して醸造への利用も当然検討され、乳酸菌 *Ped. soyae* の添加^{152,153)}、醤油酵母 *S. rouxii* と乳酸菌 *Ped. soyae* の混合添加^{154~157)}、によって香味優れ、風味の調和した諸味が得られる、と報告された。

これと関連して醤油酵母 *S. rouxii* が高濃度の食塩存在下で生育する場合には、ビタミン、アミノ酸類を必要とする¹⁵⁸⁾、と同時に、高濃度のグルコースの存在¹⁰⁹⁾、乳酸菌 *Pediococcus* などによるpHの低下¹⁵⁹⁾が必要であり、醸造初期におけるpHが徐々に低下するような場合は、*Torulopsis* 属酵母が先行してpHを下げ、その後 *S. rouxii* が優勢に発育して醤油諸味熟成に重要な役割を演ずることが強調されている¹¹⁷⁾。

分析機器の発達は醤油香気の研究分野にも大きく貢献し、その成分として1946年以降、アルデヒド類^{160~169)}、アミノエステル^{170~172)}、フェノール性成分^{173~181)}、 α -ジケトン類^{182~186)}などが組上に上った後、フェノール系化

合物が重要視されるに至り、極く最近、横塚氏^{187~189)}は、4-エチルグワヤコール、4-エチルフェノールをその成分として挙げ、*T. versatilis* にその生成特性のあることを報じしている。

小幡氏^{190~196)}は香気成分に関し、分析的手法によっては醤油香気本来の性質が損われる恐れがあるとして、可能性ある化合物、特に含硫アミノ酸、メルカプタン、アルデヒド、不飽和アルデヒド、不飽和ケトンなどを素材として化合物を合成し、種々の醤油様香気を得ている。

第1章 北海道産醤油諸味酵母の種類とその分布

醤油には濃口、淡口、溜、甘露などの種類があるが、北海道においては濃口のみが生産されている。生産工程から見ると、天然醸造のほかにはアミノ酸分解過程を塩酸によって行なう新式2号といわれる速成醸造や、アミノ酸添加醤油がある。

北海道における天然醸造法は、一般的手法とほとんど変るところがなく、工程を概略すれば次のようになる(図1)。すなわち、蒸した小麦粃および焙炒した小麦を割砕し、これと、撒水して水分を含ませた脱脂大豆および浸漬した大豆を合わせて蒸煮したものとの混合し、適度に冷却した後、種麴 (*Aspergillus oryzae* の孢子) を混合し、27~28°C、約70時間で製麴する。これと食塩水とを混じた諸味を醸酵槽に仕込み、醸酵、熟成させる。熟成期間は3~6カ月といわれている。熟成後の諸味は圧搾して生揚醤油を得、火入れて塩詰、樽詰の製品とする。

一般に仕込時期としては晩秋から中春がよいとされ、夏の高濃期に旺盛な醸酵を行なって後、熟成期に入り、約10~15カ月を経るといふ。2土用を経過したものが最

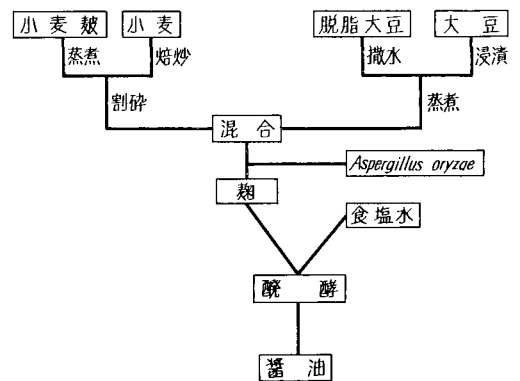


図1 醤油製造工程

良であるといわれる。

この章では北海道産醤油諸味中に存在する酵母の実態を把握する目的で、北海道内各地の醤油諸味を集め、酵母を分離して分類学的諸性質を検討した上、これらの分布状態を調べ、さらに品質との関係について考察した結果を述べる。

第1節 酵母の分離と分類

広く北海道内各地から醤油諸味試料を集めて酵母を分離し、分類学的検討を行なった。

実験方法

a) 試料

醤油諸味試料の採取には殺菌した150 ml容のスクリーキャップ付ポリエチレン壺を用い、これを各工場宛送付した。

試料採取に当っては諸味中の酵母の種類が主醸酵の前後において交替する可能性も考え、存在する酵母の種類が最も多いと思われる仕込後2~3カ月の諸味を集めることとし、醸酵槽の中心で、表面下約10 cmの部分の諸味を採取するよう指示した。

b) 酵母の分離

酵母の分離には葡萄糖馬鈴薯寒天培地 (PGagar) を平板として用いた。PGagarは剥皮洗滌して細断した馬鈴薯300gと麦芽根50gを水1ℓに浸漬、煮沸して布濾し、

水を補って濾液を1ℓとし、中和後、2%の割に寒天を加えて煮沸、溶解する。これに2%のグルコースを加え、溶解した後、試験管に分注、25ポンド圧蒸気で瞬間滅菌した。

食塩濃度は、好塩型、耐塩型酵母なども充分検出できるよう食塩無添加のほか、5%、15%添加の3段階として用いた。

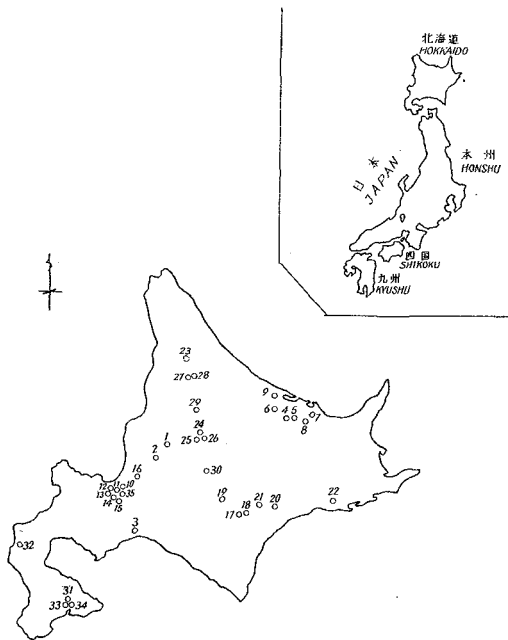
また平板に流し込む際に、滅菌した1%乳酸溶液1mlを加え、pHを約4.2に調整した。

試料は充分に攪拌し、できるだけ均一にした後、その約0.2gをとり、寒天平板に一面によく塗抹し、27°Cで1週間培養した。培養後の平板に出現したコロニーは検鏡して確かめ、異種類と思われるものを別々に計数した後、種類別に適宜これを分離した。分離した菌株については同培地による平板培養を繰返して純粋培養とした。

c) 酵母の分類、同定

主としてLODDERおよびKREGER-VAN RIJ⁸¹⁾の分類方式により、形態学的諸性質(胞子形成、栄養細胞の形、大きさ等、麦芽汁および麦芽汁寒天培養状態、疑菌糸の形成等)および生理学的性質(糖類醱酵性、糖類同化性、硝酸カリ同化性、エタノール資化性、高濃度食塩培地における生育、高濃度糖類の醱酵性、リトマス牛乳培養状態等)について試験、検討した。

菌株はPGagarに2回継いだ後供試した。



試料番号	地方名	地区名
1	空知	川
2		滝井江
3	釧路	小牧
4,5	北見	北見
6		留邊
7		網走
8		美幌
9		美幌別
10-15,35	石狩	札幌
16		札幌別
17,18	十勝	江帯
19		本帯
20		本帯別
21		幕別
22	釧路	別路
23	上	深川
24-26		寄寄
27,28		名寄
29		寒野
30		和良
32	渡島	富良
31,33,34		函

図2 試料採取地

表1 試料採取地および試料の品質

地方名	地区名	試料番号	香 気	品 質	備 考		
空 知	滝 川 奈 井 江	1	アルコール臭	良 上			
		2	甘 い 香 り	良			
胆 振	苦 小 牧	3	アルコール臭, エステル臭	優			
北 見	北 見	4	甘い香り, 焦げ臭	良			
		5	か び 臭	可			
		6	エステル臭, 焦げ臭	良 上			
	留 辺 薬 網 走	7	やや焦げ臭	良			
		8	アルコール臭, エステル臭	優			
		9	エステル臭, 焦げ臭	良 上			
	石 狩	礼 幌	10	甘 い 香 り	良		
			11	エステル臭, 香りが薄い	良	醗酵が遅れた感じ	
			12	か び 臭	可		
13			アルコール臭	良 上			
14			甘 い 香 り	良	再生仕込と思われる		
15			ややエステル臭, 香りが薄い	良			
35			エステル臭	秀			
16			エステル臭	秀			
十 勝			江 別 帯 広	17	甘い香り, 焦げ臭	良	
				18	甘い香り, 焦げ臭	良	溜り醤油諸味様
	19	甘い香り, 焦げ臭		良			
	20	甘い香り, エステル臭		良 上			
	21	香りが薄い		良	醗酵が遅れた感じ		
釧 路	釧 路	22	香りが薄い	良	塩分過剰と思われる		
上 川	美 深 旭 川	23	アルコール臭, 焦げ臭	良			
		24	アルコール臭	秀			
		25	アルコール臭, エステル臭	優			
		26	エステル臭, 甘い香り	優			
	名 寄	27	不 潔 臭	不 可			
		28	エステル臭	優			
	和 寒 富 良 野	29	アルコール臭	優			
		30	焦げ臭, エステル臭	可			
	渡 島	瀬 棚 函 館	32	不 潔 臭	不 可		
			31	アミノ酸臭	不 可		
33			エステル臭	良			
34			不 潔 臭	可			

実験結果および考察

a) 試 料

集められた試料は表1および図2に示すように、北海道内35工場からの35点である。各試料について、採取地、官能検査結果による品質評価なども同表に一括した。

試料35点中、品質特に優れていると判断されたもの(秀および優)は9点、約26%であった。

b) 酵母の分離

供試35試料からの純粋分離酵母は合計742株で、各試料別、食塩濃度別の菌株数を表2に示した。すなわち、食塩無添加培地により203株、5%添加培地で323株、

表2 分離菌株数

分離培地の 食塩濃度 (%)	分離菌株数			
	0	5	15	計
1	3	14	11	28
2	4	9	9	22
3	2	7	5	14
4	6	4	4	14
5	2	12	5	19
6	4	10	4	18
7	10	8	8	26
8	6	9	6	21
9	1	16	6	23
10	10	10	12	32
11	6	11	6	23
12	4	6	7	17
13	2	6	6	14
14	1	5	9	15
15	5	7	4	16
16	9	12	5	26
17	10	6	9	25
18	5	5	5	15
19	13	12	6	31
20	9	12	7	28
21	8	12	5	25
22	15	10	6	31
23	5	4	6	15
24	5	13	5	23
25	5	10	7	22
26	3	12	4	19
27	6	11	4	21
28	11	10	4	25
29	9	12	6	27
30	3	6	5	14
31	4	14	5	23
32	4	10	5	19
33	4	6	6	16
34	5	6	6	17
35	4	6	8	18
	203	323	216	742

15% 添加培地で216株であった。5% または15% 濃度の食塩添加培地から分離された酵母については、耐塩性のあることが考えられるが、いずれの試料においても、食塩添加培地からの分離株数はかなりあり、耐塩性酵母の多いことを示している。また、食塩無添加培地におけるよりも5% または15% 食塩添加培地における分離株

表3 分離酵母の菌種名

菌種名	分離培地の食塩濃度 (%)		
	0	5	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HANSEN			32
<i>Torulopsis sake</i> (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ	67	53	
<i>Saccharomyces rouxii</i> BOUTROUX	80	91	138
<i>Saccharomyces fructuum</i> LODDER et KREGER-VAN RIJ			3
<i>Saccharomyces bisporus</i> (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ	1	3	
<i>Saccharomyces mellis</i> (FABIAN et QUINET) LODDER et KREGER- VAN RIJ	1		
<i>Hansenula anomala</i> HANSEN H. et P. SYDOW		5	
<i>Hansenula subpelliculosa</i> BEDFORD			3
<i>Debaryomyces halotolerans</i> SASAKI et YOSHIDA	1	2	
<i>Candida tropicalis</i> (CASTELLANI) BERKHOUT	1	1	
<i>Candida guilliermondii</i> (CASTEL- LANI) LANGERON et GUERRA	5		
<i>Candida parapsilosis</i> (ASHFORD) LANGERON et TALICE	4	2	
<i>Candida solani</i> LODDER et KREGER-VAN RIJ	1		
<i>Torulopsis gropengiesseri</i> (HARRISON) LODDER	1	30	1
<i>Torulopsis bacillaris</i> (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER	8	2	1
<i>Torulopsis famata</i> (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ		4	11
<i>Torulopsis versatilis</i> (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ	19	38	16
<i>Torulopsis anomala</i> LODDER et KREGER-VAN RIJ	8		
<i>Torulopsis etchellsii</i> LODDER et KREGER-VAN RIJ	3	20	38
<i>Torulopsis magnoliae</i> LODDER et KREGER-VAN RIJ		35	7
<i>Torulopsis nadaensis</i> ONISHI			1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (JÖRGENSEN) HARRISON	2	1	
<i>Sporobolomyces roseus</i> KLUYVER et VAN NIEL	1	1	
	203	323	216
	742		

数が明らかに多い24試料(試料番号1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32,

33, 35) では耐塩性酵母とともに好塩性酵母の存在が推測される。

c) 酵母の分類

供試 742 株の分類結果は表 3 に示すように、1 新種を含む 7 属 23 種であった。このうち、食塩を添加した培地からのみ得られた酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae*, *S. fructuum*, *Hansenula anomala*, *H. subpelliculosa*, *Torulopsis famata*, *T. magnoliae*, *T. nodansensis* の 7 種があり、食塩無添加培地からのみ分離された酵母としては、*S. mellis*, *T. anomala*, *Candida guilliermondii*, *C. solani* の 4 種があって、菌種により、食塩に対する態度が特徴的なことが考えられる。

以下に分類学的諸性状について記述する。

1. *Debaryomyces halotolerans* SASAKI et YOSHIDA イ. 形態学的性状

異体接合によって子嚢を形成し、そのなかに 3~4 個、通常 4 個の胞子を形成する。胞子は球形ないし卵形で、内部に通常 1 個の油滴を有す。

麦芽汁、25°C、3 日間培養では沈渣を生じ、薄く管壁を上る皺状の皮膜を形成する。細胞は球形ないし卵形で、幅 1.5~6 μ、長さ 2.4~7.2 μ、単独または対をなして見られる。17°C、1 カ月後の培養は、泥質、クリーム色の沈渣多く、皮膜は白色で薄く、著しく皺状となる。

麦芽汁寒天、25°C、3 日間培養では、細胞は球形ないし卵形、幅 2~5 μ、長さ 2~7.5 μ の大きさで、単独かまたは対となって見られる。17°C、1 カ月後の培養は、淡黄褐色から淡黄桃色に変り、糸状、または羽毛状に生育し、扁平で表面平滑であるが幾分粉状となる。その縁辺は波状で、樹状に发育した細胞により繊毛状を呈する。

Slide culture では卵形ないし長卵形の細胞が樹状に生育するが疑菌糸は形成しない。

多極性出芽をなす。

ロ. 生理学的性状

グルコース、ガラクトースを同化、醗酵し、マルトースを同化する。サッカロースの同化性、醗酵性は甚だ微弱である。ラクトースは同化も醗酵もしない。

硝酸カリは同化しない。

エタノールをよく利用して生育し液面に“Kahmhaut”を形成する。

25% 食塩含有培地に生育して全面皺状を呈す。

リトマス牛乳培養は青色に変じ、ペプトン化が見られる。

この酵母は、子嚢胞子を形成すること、硝酸カリを同化しないこと、から、*Saccharomyces*, *Pichia*, あるいは

Debaryomyces 属のいずれかに属する。

このうち *Saccharomyces* 属酵母は細胞が一般に diploid で、糖類醗酵性の強いのを特徴とする。しかし、分離された供試酵母は、異体接合を行なって子嚢胞子を形成するのが普通で、したがって栄養細胞は haploid と考えてよい。また醗酵性についてもガラクトース、サッカロースの醗酵性は弱く、時にはグルコースの醗酵でさえも弱い場合があり、液体培地で“Kahmhaut”を形成するという点もこの酵母の特性で、*Saccharomyces* 属とは明らかに異なる。

Pichia 属は、1904 年、HANSEN 氏¹⁹⁷⁾によって創られ、液体培地に速やかに皮膜をつくることを特徴とし、その胞子は半球形か不規則な形で角ばっており、醗酵性なく、疑菌糸をよくつくる、と記載されている。その後、KLÖCKER 氏¹⁹⁸⁾により、子嚢胞子が球形で、胞子形成前に接合を行なうこと、弱い醗酵性を有すること、が付け加えられ、さらに STELLING-DEKKER 女史¹⁹⁹⁾によって栄養細胞の形が様々で、疑菌糸をつくる傾向をもつことが示された。

これらの点を基として LODDER 女史⁸¹⁾は、*Pichia* 属を次の様に定義している。すなわち、「細胞は卵形、長卵形、円筒形など様々で、多極性出芽を行ない、疑菌糸を形成する。子嚢は異体接合の後、あるいは接合なしに形成され、胞子は半球形、帽子形で、表面平滑かあるいは角ばっており、子嚢中に 1 ないし 4 個形成され、通常 1 個の油滴を含む。液体培地に乾いた不透明な皮膜を形成し、酸化的代謝を主とする。硝酸塩は同化せず、アルブチンは分解できないか、極く弱く分解する」となっている。

一方、*Debaryomyces* 属は 1909 年、KLÖCKER 氏が始めて記載し、胞子は一層の膜からなり、表面粒状であることを特徴とし、さらに 1924 年、子嚢形成が無性的にか、あるいは接合後に行なわれるとし、栄養細胞は球形で、グルコースを醗酵することを付記している²⁰⁹⁾。また、GUILLIERMOND 氏²⁰¹⁾は、この属の酵母が同体接合か、多くは異体接合によって子嚢を形成すること、胞子は子嚢中に 1 個、稀に 2 あるいは 3 個形成され、1 個の油滴を含むこと、栄養細胞は一般に球形で、1 個の油滴を含むことなどを特性とすることを記している。さらに STELLING-DEKKER 女史¹⁹⁹⁾は、栄養細胞が主に球形で小さく、液体培地では沈渣のほかリング状发育をし、稀に皮膜をつくり、醗酵性はないか、稀に強いことがあることを付け加え、LODDER 女史⁸¹⁾は疑菌糸形成が極く未発達か、稀によく発達するものがあるが、多くは

形成しないこと、と、栄養細胞が haploid であることを記している。

これらの諸特性を照し合わせて見ると、*Pichia*、*Debaryomyces* 両属の差として挙げられるものは、栄養細胞の形と疑菌糸の形成とすることができる。すなわち、*Pichia* の細胞は比較的長く、疑菌糸をよく形成するが、*Debaryomyces* の細胞は比較的球形で、疑菌糸は形成しないか、ほとんど未発達である。

この点を参考とすれば、供試酵母は、ほとんどが球形ないし卵形の細胞であること、と、未発達の疑菌糸が形成されるに過ぎないことから、*Debaryomyces* 属に入れるのが妥当と考えられる。

LODDER 女史らの分類系で *Debaryomyces* に属する酵母は、*D. hansenii*、*D. kloockeri*、*D. subglobosus*、*D. vini* および *D. nicotianae* の5種となっている。供試酵母は、細胞形態および大きさの点ではこれら5種のいずれにも類似しているが、明らかに異なる2つの特徴がある。その一つは、供試酵母は常に異体接合を行なって子嚢を形成し、そのなかに4個の、ほぼ球形で、1個の油滴を含む孢子を形成することであり、また他の一つは、グルコース、ガラクトースを醗酵し、グルコース、ガラクトースおよびマルトースを同化するが、サッカロースの醗酵性、同化性が微弱なことである。これらの特性に類するものとして *D. vini* があるが、表4に示すように、この酵母は供試酵母と比較して細胞が幾分小さく、皮膜をつくらず、疑菌糸を形成する、などの点で明らかに異なっており、LODDER 女史らの分類系には供試酵母に該当するものはない。

1954年 DIMENNA 氏²⁰²⁾は、異体接合の結果、1~4個の孢子を形成する *D. marama* を空中から分離し、新種として報告した。しかし、グルコースのみを醗酵すること、グルコース、ガラクトース、マルトースのほかサッカロースをもよく同化することで供試酵母とは異なる(表4)。

また CAPRIOTTI 氏²⁰³⁾も4個の孢子を形成する新種 *D. castellii* を記載、発表したが、これは、細胞大きく、疑菌糸の発達よく、ガラクトースを醗酵せず、マルトースを醗酵し、ラクトースを同化するなど、供試酵母とはかなり異なるものである(表4)。

これらの特性から見て、供試酵母は新種であると断じ、25%の食塩を含む培地にも生育することから、*Debaryomyces halotolerans* SASAKI et YOSHIDA と命名した。

この種は、函館の試料から、分離用平板上に極く少数

表4 *Debaryomyces halotolerans* SASAKI et YOSHIDA と類縁菌の性質比較

細胞形	培養状態		疑菌糸	胞子	醗酵性		同化性					KNO ₃ 同化性	リトミスクラ	マトル糖	エタノール質化性	備考	菌種名
	麦芽汁	麦芽汁寒天			Gl	Ga	S	M	L	Gl	Ga						
球~卵形、(2.2~4.6)×(3.2~6.0)μ。	球状、発芽、島嶼状生育。	淡黄色、純光沢を有し、縁状となる。辺波状。	よく発達。	異体又は同体接合により1~4個、球形の胞子を内生。	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Debaryomyces vini</i> ZIMMERMAN	
球~卵形、(2.5~5.0)×(2.5~6.5)μ。	管壁を上る乾いた皮膜を早くに形成。	白色湿光沢ないし古く、従い、皺状となる。	-	異体接合により1~4個の球形の胞子を内生。	W	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>D. marama</i> DI MENNA	
球~卵形、(3.0~10.0)×(3.0~10.0)μ。	管壁を上る皺のある皮膜を形成。	純光沢を有す。	よく発達。	稀に同体接合により子嚢形成。1~4個の胞子を内生。	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>D. castellii</i> CAPRIOTTI	
球~卵形、(1.5~6.0)×(2.4~7.2)μ。	管壁を上る皺状の皮膜を形成。	淡黄褐色、扁平、幾分粉状となる。	樹状発育を示す。疑菌糸は形成しない。	異体接合により子嚢形成。1~4個の球形の胞子を内生。	+	W	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>D. halotolerans</i> SASAKI et YOSHIDA	

Gl: グルコース S: サツカカロース M: マルトース L: ラクトース +: 有り -: 無し W: 弱い

酵母の分類検索表

子嚢胞子を形成する。(Class: Ascomycetes).

子嚢は裸出する。(Subclass: Protoascales).

子嚢は細胞の接合によって形成されるかまたは接合なしに直接形成される。(Order: Endomycetales).

細胞は分裂法か出芽法によって増殖し、真菌系、疑菌系、節胞子を生ずるものがある。(Family: Endomycetaceae).

菌体は酵母状で、子嚢胞子は針状とならない。(Subfamily: Saccharomycetoideae).

細胞は多極性出芽により増殖し、疑菌系を生ずるが真菌系をつくらない。大部分は強い醗酵性を示す。(Tribe: Saccharomycetaceae).

硝酸塩を同化しない。

皮膜を形成せずリングを生ずる。

胞子は球形で表面平滑。グルコースを強く醗酵する。(Genus *Saccharomyces* (MEYEN) REESS).

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを醗酵、同化する。…*Saccharomyces cerevisiae* HANSEN.

グルコース、ガラクトース、サツカロースを醗酵、同化し、マルトースを同化する。……………*S. fructuum* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコース、マルトースを醗酵、同化し、ガラクトースを同化する。……………*S. rouzii* BOUTROUX.

グルコースを醗酵、同化し、ガラクトースを同化する。……………*S. bisporus* (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコースを醗酵、同化する。……………*S. mellis* (FABIAN et QUINET) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

管壁を上り皺のある乾いた薄い皮膜を形成する。

胞子は球形。

グルコースの醗酵性は弱い。(Genus *Debaryomyces* LODDER et KREGER-VAN RIJ).

グルコース、ガラクトースを醗酵、同化する。マルトースを同化する。

サツカロースの醗酵性、同化性は弱い。……………*Debaryomyces halotolerans* SASAKI et YOSHIDA.

硝酸塩を同化する。

疑菌系を形成し、管壁を上る乾いた皮膜を形成する。(Genus *Hansenula* H. et P. SYDOW).

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを醗酵、同化する。……………*Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.

グルコース、サツカロースを醗酵、同化する。ガラクトース、マルトースを同化する。……………*H. subpelliculosa* BEDFORD.

Ballistosporeを形成する。(Class: Basidiomycetes).

細胞は酵母状で多極性出芽により増殖し、真菌系、疑菌系を形成する場合もある。

細胞の一部に通常1個の鞭子を生じ ballistospore を放出する。(Family: Sporobolomycetaceae).

Ballistospore は非対称で腎臓型をなし、淡赤色または桃色を呈す。(Genus *Sporobolomyces* KLUYVER et VAN NIEL).

硝酸塩を同化する。

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを同化する。……………*Sporobolomyces roseus* KLUYVER et VAN NIEL.

胞子を形成しない。(Class: Deuteromycetes).

分生子を生ぜず、細胞は暗色とならない。(Order: Cryptococcales).

細胞は出芽法により増殖し、分裂して増殖する場合もある。真菌系、疑菌系、節胞子を生ずる場合もある。(Family: Cryptococcaceae).

節胞子を生ぜずカロチノイド系色素を生成しない。(Subfamily: Cryptococcoideae).

細胞は球形ないし卵形で、真菌系、疑菌系をつくらない。莢膜をつくらず被粉様物質をつくらず、醗酵または酸化作用を有する。(Genus *Torulopsis* BERLESE).

硝酸塩を同化しない。

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを醗酵、同化する。……………*Torulopsis sake* (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコース、サツカロースを醗酵、同化する。ガラクトースを同化する。……………*T. gropengiesseri* (HARRISON) LODDER.

グルコース、サツカロースを醗酵、同化する。……………*T. bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

グルコースを醗酵、同化し、ガラクトース、サツカロース、マルトースを同化する。……………*T. famata* (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

硝酸塩を同化する。

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトース、ラクトースを醗酵、同化する。……………*T. versatilis* (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコース、ガラクトースを醗酵、同化し、マルトースを同化するが醗酵性は弱いかこれを欠く。……………*T. anomala* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコースを醗酵、同化する。ガラクトース、マルトースを同化するがマルトースの醗酵性は弱いかこれを欠く。……………*T. etchellsii* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

グルコース、ガラクトースを醗酵、同化し、サツカロースを同化する。……………*T. nodaensis* ONISHI.

グルコースを醗酵、同化し、ガラクトース、サツカロースを同化する。……………*T. magnoliae* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

細胞は球形ないし卵形で真菌系をつくらず、疑菌系を形成する。(Genus *Candida* BERKHOUT).

硝酸塩を同化しない。

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを醗酵、同化する。……………*Candida tropicalis* (CASTELLANI) BERKHOUT.

グルコース、サツカロース、マルトースを醗酵、同化する。ガラクトースを同化する。……………*C. guilliermondii* (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA.

グルコースを醗酵、同化し、ガラクトース、サツカロース、マルトースを同化する。ガラクトースの醗酵性は弱いかこれを欠く。……………*C. parapsilosis* (ASHFORD) LANGERON et TALICE.

グルコースを醗酵、同化し、サツカロース、マルトースを同化する。……………*C. solani* LODDER et KREGER-VAN RIJ.

節胞子を生ぜず、カロチノイド系色素を生産する。(Subfamily: Rhodotoruloideae).

細胞は卵形で真菌系、疑菌系をつくらず、醗酵性なく、酸化分解により異化する。(Genus *Rhodotorula* HARRISON).

硝酸塩を同化しない。

グルコース、ガラクトース、サツカロース、マルトースを同化する。……………*Rhodotorula mucilaginosa* (JÖRGENSEN) HARRISON.

が見出されたに過ぎない。

(以下、既知の菌種の記載は省略する)。

2. *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN⁸¹⁾
3. *Saccharomyces rouxii* BOUTROUX^{7,8,17,18,19,81,199,204,205)}
- *4. *Saccharomyces fructuum* LODDER et KREGER-VAN RIJ⁸¹⁾
5. *Saccharomyces bisporus* (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,199,206,207)}
- *6. *Saccharomyces mellis* FABIAN et QUINET LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,208)}
7. *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW^{81,209)}
8. *Hansenula subpelliculosa* BEDFORD^{81,209)}
9. *Sporobolomyces roseus* KLUYVER et VAN NIEL^{81,210,211)}
- *10. *Torulopsis sake* (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,213)}
11. *Torulopsis gropengiesseri* (HARRISON) LODDER^{81,214)}
- *12. *Torulopsis bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER^{81,215)}
- *13. *Torulopsis famata* (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,216)}
14. *Torulopsis versatilis* (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,217)}
- *15. *Torulopsis anomala* LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,217)}
16. *Torulopsis etchellsii* LODDER et KREGER-VAN RIJ^{81,217)}
17. *Torulopsis magnoliae* LODDER et KREGER-VAN RIJ⁸¹⁾
18. *Torulopsis nodaensis* ONISHI^{84,218)}
19. *Candida tropicalis* (CASTELLANI) BERKHOUT^{81,210)}

20. *Candida guilliermondii* (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA^{81,212)}
21. *Candida parapsilosis* (ASHFORD) LANGERON et TALICE⁸¹⁾
22. *Candida solani* LODDER et KREGER-VAN RIJ⁸¹⁾
- *23. *Rhodotorula mucilaginosa* (JÖRGENSEN) HARRISON^{81,210,215,219)}

d) 酵母の分類検索表 (300 ページ参照)

第2節 酵母の分布についての考察

分離した酵母の各菌種について、その分布状態を地域ならびに品質との関連において眺め、各酵母の、醸造における重要性について考察した。

I. 分離酵母の分布と地域について

各酵母菌種の地域的な分布状態を表5に示した。分離された地域は○印をもって示してある。

これを見ると、北海道内の醤油諸味中には *Saccharomyces* 属酵母と、*Torulopsis* 属酵母が広く存在することが考えられる。特に *S. rouxii* は全試料から多量に分離され、諸味醸造に最も大きな影響を与えることが推察される。

わが国では古くから *S. soya*, *Zygosaccharomyces soya*, *Z. japonicus*, *Z. major* などの酵母がいわゆる醤油酵母とされ、諸味醸造の主役をなすとされしおり^{8,17,18,19,71)}, LODDER 女史ら⁸¹⁾によって、*S. rouxii* に一括統合されたとは云え、これが醤油諸味醸造における中心的役割を果していることは疑いない。大西氏^{84,117)}が、わが国の代表的な、野田地方の醤油諸味について調べた結果でも醸酵期の諸味には圧倒的に *S. rouxii* の多いことが確かめられている。この点では、北海道内の醤油諸味についても全く同様の性格をもつものと見ることが出来る。

S. rouxii と近縁関係にあると思われる *S. cerevisiae* および *Torulopsis sake* も *S. rouxii* とほぼ同程度の広

* J. LODDER 編 The Yeasts, A taxonomic study, 1970 年版では次のようになっている。

- 4.→*Saccharomyces chevalieri* GUILLIERMOND.
- 6.→*Saccharomyces bisporus* (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ var. *mellis* (FABIAN et QUINET) VAN DER WALT.
- 10.→*Candida sake* (SAITO et OTA) VAN UDEN et BUCKLEY.
- 12.→*Torulopsis stellata* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.
- 13.→*Torulopsis candida* (SAITO) LODDER.
- 15.→*Torulopsis versatilis* (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
- 23.→*Rhodotorula rubra* (DEMME) LODDER.

表5 分離酵母の地域的分布

菌種名	空知		胆振		北見			石狩	十勝			釧路	上川			渡島				
	滝川	奈井江	苫小牧	北見	留辺	網走	美幌	札幌	帯広	清水	本別	幕別	釧路	美深	旭川	名寄	和寒	富良野	函館	瀬棚
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○			○	○	○			○	○
(<i>Torulopsis sake</i>)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>S. rouxii</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>S. fructuum</i>					○		○													
<i>S. bisporus</i>		○						○												
<i>S. mellis</i>		○									○									
<i>Hansenula anomala</i>								○												○
<i>H. subpelliculosa</i>											○									
<i>Debaryomyces halotolerans</i>																				○
<i>Candida tropicalis</i>								○												○
<i>C. guilliermondii</i>						○					○									○
<i>C. parapsilosis</i>											○									○
<i>C. solani</i>																				○
<i>Torulopsis bacillaris</i>					○			○			○	○								○
<i>T. gropengiesseri</i>	○	○			○	○	○	○	○		○						○	○	○	○
<i>T. famata</i>	○	○	○		○			○		○	○									○
<i>T. versatilis</i>	○		○		○	○	○	○	○	○	○			○	○	○				○
<i>T. anomala</i>										○										
<i>T. etchellsii</i>	○	○					○	○	○	○	○			○	○					○
<i>T. magnoliae</i>	○	○						○	○		○	○		○	○	○	○	○		○
<i>T. nodaensis</i>										○										
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>											○			○						
<i>Sporobolomyces roseus</i>			○							○										

汎な分布を示している。これらは全般に出現頻度も高く、*S. rouxii* とともに北海道内醬油諸味の醱酵醸造の過程で主要な役割を果たすものと見られる。

その他の *Saccharomyces* 属酵母として *S. fructuum*, *S. bisporus* および *S. mellis* がある。これらはいずれもかなりの耐塩性をもつが、出現頻度は小さく、その分布も地域的に限られているように思われる。

Torulopsis 属酵母は *Saccharomyces* 属酵母群に次いで広い分布を示した。このうち、最も広く、且つ、多数分布すると思われるのは *Torulopsis versatilis* で、諸味の性格に及ぼす影響も大きいと考えられる。また *T. etchellsii* と、これと性状がよく似ている *T. famata*, *T. magnoliae* および *T. gropengiesseri* がこれに次いで広い分布を示し、量的にもかなり多いので、諸味熟成における重要性がうかがえる。

Hansenula, *Debaryomyces*, *Candida* 各属の酵母と

赤色酵母 *Sporobolomyces* および *Rhodotorula* は、その存在がほとんど一、二の試料に限られ、地域的というよりは、むしろ試料によって特徴的な酵母とも受取られる。ことに *Candida* 属酵母や赤色酵母は、元来自然界に分布の広い菌であり、耐塩性もないことから、諸味中では不活性な混入雑菌と見てよいようである。

II. 分離酵母の分布と諸味の品質について

分離酵母菌株の分布を諸味の品質と関連づけて表わしたのが表6である。この表は、試料諸味の官能検査結果により、品質特に優れたものから、秀、優、良上、良、可、および不可と左から右へ向って順に試料番号によって配列し、菌種の分布を示したものである。

Saccharomyces rouxii, *S. cerevisiae*, および *Torulopsis sake* の *Saccharomyces* 属酵母群と *T. versatilis* は、品質の良否にかかわらず各試料に多量に存在して

表6 分離酵母と品質との関係

試料番号 菌種名	秀			優						上					良											可					不可				
	16	24	35	26	28	8	25	29	3	13	20	9	6	1	10	2	15	17	33	19	4	7	23	21 ¹	18	14 ³	22 ⁴	11 ²	30	12	34	5	27 ⁵	32 ⁶	31
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				○	○	○	○	○		○	○	○	○		○					○	○			○	○				○	○	○		○	○	
(<i>Torulopsis sake</i>)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○			○	○		○	○	○			○	○			○	○	○	○	○
<i>S. rouxii</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>S. fructuum</i>						○						○	○																						
<i>S. bisporus</i>										○					○	○																			
<i>S. mellis</i>											○																								
<i>Hansenula anomala</i>			○																																○
<i>H. subpelliculosa</i>											○																								
<i>Debaryomyces halotolerans</i>																																			○
<i>Candida tropicalis</i>			○																																○
<i>C. guilliermondii</i>											○											○													○
<i>C. parapsilosis</i>											○																								○
<i>C. solani</i>																																			○
<i>Torulopsis bacillaris</i>			○								○						○				○					○			○						
<i>T. gropengiesseri</i>	○							○				○	○	○	○	○	○				○		○				○		○	○	○				○
<i>T. famata</i>								○		○	○	○	○	○	○	○	○														○				○
<i>T. versatilis</i>		○		○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		○			○		○	○		○	○	○				○	○	○		
<i>T. anomala</i>																		○																	
<i>T. etchellsii</i>	○	○	○	○	○	○				○	○		○		○	○	○	○	○					○	○	○			○	○	○				
<i>T. magnoliae</i>	○	○		○	○			○		○	○	○	○		○	○	○							○		○			○	○	○				
<i>T. nodaensis</i>																		○																	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>								○													○														
<i>Sporobolomyces roseus</i>									○																○										

1, 2: 醱酵が遅れたと考えられるもの 3: 再生仕込と思われるもの 4: 食塩過剰と思われるもの
 5, 6: 不潔臭あるもの

おり、いずれもアルコール酸酵力が強く、諸味醱酵においては、基本的な下地造りを行なうもののように思われる。

風味特に優れ、芳醇とされた3試料(試料番号16, 24, 35)と、最も品質が悪いとされた3試料(試料番号27, 32, 31)とを比較すると、後者3試料には共通して *T. versatilis* と *T. etchellsii* および *T. magnoliae* の3酵母が欠けている特徴を見ることが出来る。特に *T. etchellsii* は品質優秀な諸味に広く分布し、諸味の優秀性とよく対応していることが分る。品質優良とされたものの中に、*T. etchellsii* の見られなかった例もあるが、*S. cerevisiae* の存在がこれを補っているように思われる。

これらのことから、諸味に優れた性格を与えるためには、*T. etchellsii* の存在と、さらには *T. versatilis*, *S. cerevisiae* の存在が意義を有するものと考えられる。中でも *T. etchellsii*, *T. versatilis* は培養中においても明らかな爽香を放つもので、品質に対する影響の重要なことが考えられる。

T. etchellsii をはじめ *T. versatilis*, *T. magnoliae*, さらに *S. cerevisiae* を含んで、酵母の分布としては好条件にありながら、試料番号21, 18, 14, 22, 11の5試料および試料番号30, 12, 34, 5の4試料、の各諸味が品質良好となり得なかったのは、試料番号21などの5試料が、醱酵遅延とか塩分過剰などの人為的な原因が禍いしているもの、あるいは、試料番号30など4試料が“かび臭”による悪評価を得た、などであり、いずれも醱酵管理の改善によって、品質良好となり得ることが考えられる。

第3節 要 約

北海道産醤油諸味酵母の実態を把握する目的で、北海道内35個所の醤油醸造工場の諸味試料から、食塩濃度0, 5, および15%の葡萄糖馬鈴薯寒天平板を用いて742株の酵母を分離し、分類ならびに分布の検討を行ない、品質との関連性、酵母の役割などについて考察した。結果を要約すれば次の通りである。

1. 分離菌株の分類学的検索の結果、これらは新種 *Debaryomyces halotolerans* を含む次のような7属23種となった。

Saccharomyces cerevisiae HANSEN.

S. rouxii BOUTROUX.

S. fructuum LODDER et KREGER-VAN RIJ.

S. bisporus (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

S. mellis (FABIAN et QUINET) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

Debaryomyces halotolerans SASAKI et YOSHIDA.

Hansenula anomala (HANSEN) H. et P. SYDOW.

H. subpelliculosa BEDFORD.

Sporobolomyces roseus KLUYVER et VAN NIEL.

Torulopsis sake (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. gropengiesseri (HARRISON) LODDER.

T. bacillaris (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

T. famata (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. versatilis (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. anomala LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. etchellsii LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. magnoliae LODDER et KREGER-VAN RIJ.

T. nodansensis ONISHI.

Candida tropicalis (CASTELLANI) BERKHOUT.

C. guilliermondii (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA.

C. parapsilosis (ASHFORD) LANGERON et TALICE.

C. solani LODDER et KREGER-VAN RIJ.

Rhodotorula mucilaginosa (JÖRGENSEN) HARRISON.

2. 各菌種の分布を検討した結果、*Saccharomyces rouxii* が全試料から多数得られたのをはじめ、*S. cerevisiae*, *Torulopsis sake*, *T. versatilis* が地域的に広汎な分布を示しており、また *T. etchellsii* とこれに近縁の *T. famata*, *T. magnoliae*, *T. gropengiesseri* がこれに次いで広く分布することが分った。これらは、いずれも耐塩性があり、諸味中において重要な影響力をもつことがうかがわれた。*S. fructuum*, *S. bisporus*, *S. mellis* はかなり耐塩性の酵母であるが、試料からの出現は稀で、地域的にも限られている。*Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* 各属の酵母と、*Sporobolomyces*, *Rhodotorula* の赤色酵母とは、その存在が極く少数の試料に認められたに過ぎず、中でも *Candida* 属酵母と赤色酵母は耐塩性もなく、単なる混入雑菌と見られる。

3. 分布と品質との関連を検べた結果、*S. rouxii*, *S. cerevisiae*, *T. sake* および *T. versatilis* は品質の如何にかかわらず、各試料に広く、多数分布していて、これらが諸味品質の基礎造りに重要な役割をもつものと考えられた。*T. etchellsii* の分布は、特に優れた品質とよく対応していた。

4. これらのことから、北海道産醤油諸味の醱酵は、

いわゆる醤油酵母 *S. rouxii* を始め、*S. cerevisiae*, *T. sake*, *T. versatilis* が中心となって行なわれていることが分り、*T. etchellsii* が諸味に優れた性格を与えるのに役立つと考えられた。

第2章 食塩濃度と酵母の生育および醸酵との関係

前章において北海道産醤油諸味酵母 742 株は、7 属 23 種に分類されることが分ったが、種類により、高濃度の食塩に対する態度の異なることが認められた。

醤油諸味は約 18% の食塩を含んでいるが、このような異常な環境においては、微生物学的に強い淘汰が行なわれていると見られ、この条件下でも旺盛に繁殖し、種類の活性を示し得るものは、諸味品質に対する影響も大きいと考えられる。

この章では、前章において分離、検討した酵母のなかから代表的な菌株を選び、その生育と醸酵に対する食塩の影響を見、諸味醸酵における各種酵母の意義を考察した。

第1節 生育に対する食塩濃度の影響

各種酵母の生育に対する食塩濃度の影響を検討した。

実験方法

a) 供試菌株

北海道内 35 工場の醤油諸味から分離した酵母のうち、

表7 生育試験用菌種および菌株数

菌 種 名	菌 株 数
<i>Saccharomyces rouxii</i>	80
<i>S. bisporus</i>	1
<i>S. mellis</i>	1
<i>Debaryomyces halotolerans</i>	1
<i>Candida guilliermondii</i>	5
<i>C. tropicalis</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	4
<i>C. solani</i>	1
<i>Torulopsis sake</i>	67
<i>T. versatilis</i>	19
<i>T. anomala</i>	8
<i>T. etchellsii</i>	3
<i>T. gropengiesseri</i>	1
<i>T. bacillaris</i>	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1

199

代表的な菌株を選び、表7に示すような6属16種、199株を用いた。

b) 培 地

前培養培地としし食塩無添加のPGagarを用いた。生育試験には、PGagar培地に、食塩を添加しないもの、1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 20, および25% (w/v) 添加のものを斜面として用いた。

c) 生育試験

食塩無添加のPGagar斜面で、27°C、3日間培養の菌体を、濃度約 10^8 cells/mlになるように0.9%滅菌食塩水に懸濁し、これを白金線により試験用斜面培地に画線し、27°Cで培養した。生育度は、培地表面での発育程度を、培養7日後に肉眼観察し、食塩無添加培地で*Saccharomyces rouxii* 80株が示した生育のうち最も良好であった生育度を5として、これと比較した生育度を0~5の6段階に表わし、各食塩濃度ごとに記録した。試験はすべて2本宛平行して行なった。

実験結果および考察

供試酵母199株の示す生育度を表8に一括した。表中の数字は、食塩濃度ごとに生育度に応じて菌株数を配列し、菌株の食塩濃度ごとの分布を示したものである。また、図3には食塩濃度と生育との関係を示すために、各食塩濃度ごとに分布菌株の最大数を結んで大凡の生育曲線とし、その生育曲線が、ほぼ3型に分けられることを典型的な5菌種によって示した。

Saccharomyces rouxii および *Torulopsis sake* は、ともに醤油諸味熟成における主要な役割を果たしているものと考えられるが、食塩に対する抵抗性は強く、食塩濃度10%までは食塩無添加の場合と同じ程度のよい生育を示す。13%以上の濃度で生育度はわずかに鈍り、20%を超えると著しく低下するが、25%においてもなおかなりの生育能力を示すものである。

LODDER 女史によれば *S. rouxii* は、60% (w/v) のグルコースを含む酵母エキス寒天にも良好に発育する“osmophily”とされており⁸¹⁾、*Zygosaccharomyces soya* および *Z. major* は20% (w/v) の食塩を含む培地上に生育し得る、と報告されている¹⁷⁾。大西氏⁸³⁾の分離した *S. rouxii* は、食塩の20~22%、グルコースおよびサッカロースの80%が生育の限界濃度とされている。

北海道産醤油諸味から得た *S. rouxii* 80株と *T. sake* 67株の耐塩性は、これらにくらべるとさらに高く、食塩濃度25%でも生育でき、長期間の培養では、無塩培地におけるほぼ同程度にまで発育する。また、両者の培養は、培地の食塩含量が増加するにしたがい、粗面の度を

8-9. *S. mellis* (1株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5										
4						1				
3	1	1	1	1	1		1	1		
2									1	
1										1
0										

8-10. *T. gropengiesseri* (1株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5						1				
4		1	1	1	1		1	1		
3	1								1	
2										
1										1
0										

8-11. *C. tropicalis* (1株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5		1								
4	1		1	1		1				
3					1		1			
2										
1								1		
0									1	1

8-12. *T. anomala* (8株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5										
4	7	4	5	5	1	1				
3	1	4	3	3	6	7	8			
2					1			8	8	
1										6
0										2

8-13. *C. guilliermondii* (5株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5	3	3	3	2	2	1				
4	2	2	2	3	2	2	3			
3					1	2	2	5	2	
2									2	
1									1	2
0										3

8-14. *C. parapsilosis* (4株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5	4	4	1	1	1	1				
4			3	3	3	3	2	2		
3							2	2	3	
2										
1									1	3
0										1

8-15. *Rh. mucilaginosa* (2株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5	2	2	2	2						
4					2					
3						2	2			
2								2		
1										
0									2	2

8-16. *Sp. roseus* (1株)

NaCl %	0	1	3	5	7	10	13	15	20	25
生育度 5	1	1								
4			1							
3				1						
2					1	1				
1										
0							1	1	1	1

増す傾向を示した。すなわち、無塩培地上の生育は平滑ないし鈍光沢を有し、3~10%食塩含有培地でほぼ粗面となり、13%以上になると培養表面全体にわたって皺状を呈するようになる。この点は高橋、湯川両氏¹⁷⁾、

ETCHELLS と BELL 両氏²¹⁷⁾ らによって耐塩性酵母について認められたところと一致している。

Debaryomyces halotolerans の耐塩性も前2者と同型になるが、生育は旺盛で、食塩20%前後までは食塩無添

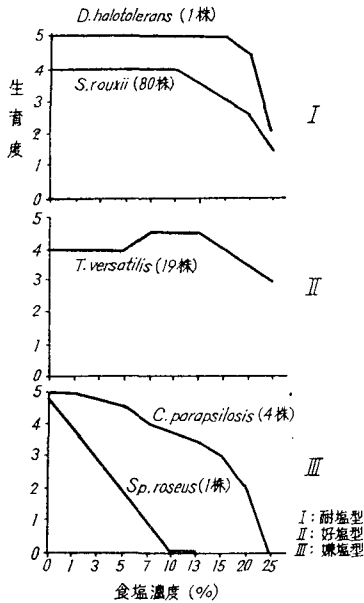


図3 種々の食塩濃度に対する分離酵母の生育型

加の場合と同様に速やかに発育し、25%にいたってやや衰える。

これら3者はいずれも食塩に対する抵抗性の高いもので、曲線の型から耐塩型と呼ぶことができる。

この型に属するものとしてはこのほかに、*Saccharomyces bisporus*, *Torulopsis bacillaris*, および *Candida solani* を挙げることができる。*S. bisporus* および *T. bacillaris* の生育は、20%の食塩濃度においてもかなり認められ、明らかな耐塩型を示す。*C. solani* は食塩濃度15%以上では生育できないが、13%までは良好な生育を示すので、弱耐塩型といえる。

Torulopsis versatilis および *T. etchellsii* は醤油諸味の品質に対する影響の大きな酵母として重要視できるが、その生育曲線は特異である。すなわち、無塩培地よりも食塩濃度5~13%における生育がよく、この範囲の食塩濃度を好む好塩型といえることができる。しかも、25%食塩培地においては、2~3週間後相当量の生育を示すほどの耐塩性をも有している。

ちなみに、*T. versatilis* および *T. etchellsii* は、もともと ETCHELLS 氏²¹⁷⁾ により“cucumber brines”から分離記載されたもので、20~24%の食塩培地に生育し、40~60%のグルコースおよびサッカロースをも醗酵し得る抗滲透圧性酵母とされている。

Saccharomyces mellis および *Torulopsis gropengiesseri* もまた3~10%の食塩培地で、より良く発育し、

25%の濃度においてもかなりの生育を示しており、*T. versatilis* や *T. etchellsii* と同型の好塩型酵母と見られる。LODDER 女史ら⁸¹⁾によれば *S. mellis* は高濃度糖液にも生育し得ると記されている。

Candida tropicalis の示す生育は、無塩培地におけるよりも1%の食塩を含む培地における生育度が良い好塩型を呈するが、この酵母は、10%以上の食塩濃度で生育が極度に低下し、15%以上の濃度ではもはや生育し得ないことから、いわば弱好塩型とでもすべきものである。

その他の菌株は、食塩濃度の増加とともに生育度が低下する嫌塩型ともいべきもので、*T. anomala*, *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, および赤色酵母がこれに属する。とくに赤色酵母 *Sporobolomyces roseus* は耐塩性がほとんどなく、食塩10%までに生育度を著しく低下し、13%以上の濃度では生育できない。この点では、同じ嫌塩型に属する他の菌種にくらべて、この種酵母が食塩の影響をはるかに強くうけるものとして強嫌塩型といえる。

これらの結果から、供試酵母を食塩濃度に対する生育度から見た場合、各菌種それぞれが特色ある型を示すことが分り、耐塩型、好塩型、と嫌塩型の3型が認められた。このうち、諸味醗酵に重要な役割をもつと考えられた *S. rouxii*, *T. sake*, *T. versatilis* および *T. etchellsii* の4者は、前2者が耐塩型、後2者が好塩型であることが明らかになったわけで、醤油諸味の食塩濃度に相当する15~20%の食塩培地においても生育甚だ良好なことから、これら4者の重要性がさらに高められたといえる。

第2節 醗酵性に対する食塩濃度の影響

1906年、齊藤氏⁸⁾は醤油諸味の微生物学的研究において、*Saccharomyces soja* の興味ある記録を残している。すなわち、培地の食塩濃度が7.5%以下あるいは20%以上では、この酵母の細胞に原形質分離がおり、7.5~20%あるいは15~20%におくと還元されるといふ。さらにまた、同じく諸味から得た *Aspergillus oryzae* のデアスターゼおよびインベルターゼなどの粗酵素液は、食塩濃度の増加とともに活性を減ずるが、20%でもなお活性を保っている、としている。また最近の研究で大西氏¹¹⁵⁾は *S. rouxii* のマルトース醗酵能が、食塩18%で消失することを認めている。これらの事柄は、耐塩性のこれらの菌が、その細胞活性あるいは酵素活性において食塩濃度と密接な関係にあることを示すものである。

前節において特に強い耐塩性をもち、好塩型の生育を示すことが分った *T. versatilis* および *T. etchellsii* は、

こういった点で甚だ興味ある酵母であり、醤油諸味の熟成過程における役割の重要性から、この特性をさらに明確にするため、同時に分離した多数の菌株をも用いて糖類醱酵性に対する食塩濃度の影響を検討した。

実験方法

a) 供試菌株

第1章において同定した *T. versatilis* 73株と *T. etchellsii* 8株とを用いた。

b) 培地

醱酵試験用の培地としては、0.5%酵母エキスに、食塩を加えないもの、および、3, 5, 15, 20, 25%の5段階の濃度に加えたものを試験管に分注、滅菌し、これに濾過除菌した糖液を3%の濃度となるように加えて用いた。

c) 実験方法

醱酵試験培地に PGagar で 27°C, 7日間前培養した菌体を大量に接種した後、27°Cに培養し、発生するCO₂ガスをスミス氏醱酵管に導いて経時的に発生量を記録した。試験は *T. versatilis* に対してはグルコース、サッカロース、およびマルトースについて行ない、*T. etchellsii* に対してはグルコースのみについて行なった。試験はすべて2本宛平行して行なった。

結果および考察

各条件において、平行試験はほとんど同一の結果を示

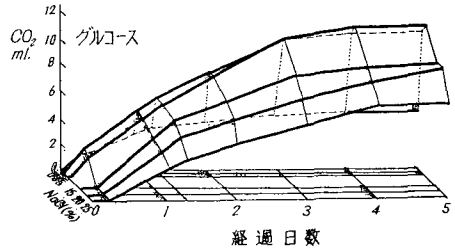


図5 種々の食塩濃度における *Torulopsis etchellsii* 2B4 のグルコース醱酵性

し、供試各菌株は菌種によりほぼ同様の醱酵経過をとった。それぞれの菌種の典型的な醱酵経過を図4および5に示した。図は、糖類からの発生CO₂量をy軸にとり、食塩濃度をx軸に、経過時間をx軸にとって醱酵経過を示してある。

T. versatilis の場合、グルコース醱酵は、食塩無添加、および3~5%添加のいずれにおいても同様の経過を示し、2日後までに最高点に達した。最高醱酵量は、対始糖理論値(22.4 ml)の70~100%となり、菌株によって幾らかの差はあるが、食塩無添加と低濃度添加の場合には強い醱酵性が認められた。食塩濃度が15%以上になると醱酵は緩慢となり、20~25%では著しく抑制される。したがって、この醱酵の図形は全体として廂が手前に傾いた形となるが、高濃度においてもかなりの醱酵力を示すものであることが分かった。この酵母によるマルトース醱酵もグルコースの場合と全く同じ経過をとった。

サッカロースの醱酵経過もこれら2つの糖に対するとほぼ同様の傾向をもつが、その醱酵能は食塩無添加、添加を問わず著しく弱く、醱酵が長期間にわたってゆるやかに続けられるという特徴を示した。この醱酵は7日後にはほぼ定常状態に達し、そのCO₂発生量は対始糖理論値の30%程度に留まった。また食塩濃度5%の場合の醱酵が、他の濃度段階におけるよりも幾分よく、好塩性の醱酵であることが認められた。

したがって、この酵母の醱酵性については、斎藤氏⁸⁾が *Aspergillus oryzae* の粗酵素液について認めたと同様、食塩濃度の増加とともに酵素活性が抑制されるという一般的な傾向が認められると同時に、これらの糖の醱酵が強い耐塩性を有するものであり、この点では *S. rouxii* のマルトース醱酵能が18%食塩の存在により失われるという大西氏¹¹⁵⁾の報告と異なっている。また、サッカロース醱酵性が幾分好塩型であると同時に著しく弱いという特異性を示したが、この酵母の生育が好塩型であったことから、これらの特性が細胞の本質に寄因す

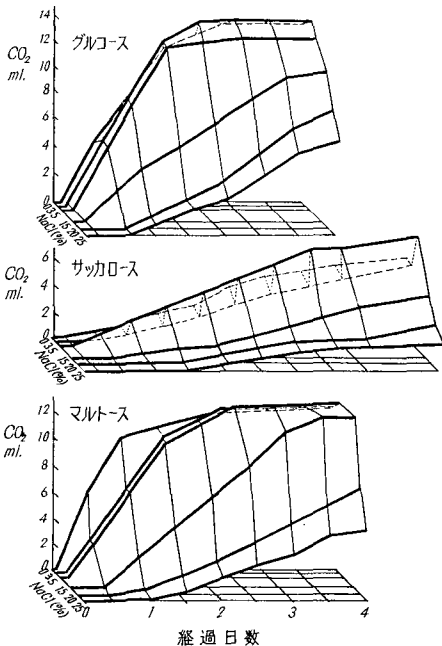


図4 種々の食塩濃度における *Torulopsis versatilis* 1B4 の糖類醱酵性

るように思われる。この点に関しては、酵素の性質、細胞の透過性、などについての詳細な検討が必要と思われる。

T. etchellsii のグルコース醱酵は、食塩に対し特異な親和性をもつことを示している。すなわち、食塩濃度が高くなると醱酵は抑えられながらも緩慢に続けられるという点では *T. versatilis* の場合と変らないが、無塩培地におけるよりも食塩添加培地における醱酵量が高く、食塩濃度が3~5%において醱酵が最大となるという甚だ顕著な特性があり、図形は中高のドーム型となる。しかも食塩無添加の場合の醱酵が、ごく初期に、はるかに低い価(対始糖理論値の約18%のCO₂発生量)で留まってしまうことが認められる。このことは *T. etchellsii* のグルコース醱酵性が食塩の存在に強く依存するものであることを示しており、本質的に好塩性であると見られる。

以上の結果から、これらの酵母による醱酵は、醤油諸味の熟成過程において、特に後期に、徐々に影響を現わして来るものと見てよく、後熟酵母としての重要性をうかがうことができる。

第3節 要 約

1. 北海道産醤油諸味から分離した酵母のうち代表的な6属16種、199株について、その生育に対する食塩濃度の影響を見たところ、これらは菌種によって食塩に対する抵抗性に差があり、食塩濃度の高い場合でも無添加の場合と同様によく生育できる耐塩型と、ある範囲の食塩濃度では、無添加の場合にくらべてむしろよく生育できる好塩型と、食塩が存在した場合、あるいは食塩濃度が高くなる程生育度が落ち、高濃度では生育不能となる嫌塩型との3型に分けられることが分った。

2. 耐塩型に属するものは、主要な醤油酵母とされる *S. rouxii* とこの近縁の *T. sake* のほか、*S. bisporus*, *Debaryomyces halotolerans*, *T. bacillaris* があり、*Candida solani* も弱耐塩型と見られる。

好塩型に属するものとしては、醤油諸味熟成に重要と見られる *T. versatilis*, *T. etchellsii* と、*S. mellis*, *T. gropengiesseri* があり、*C. tropicalis* が弱好塩型と考えられる。その他、*T. anomala*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* および赤色酵母は嫌塩型で *Sporobolomyces roseus* は特に強嫌塩型といえるもので、食塩に対する抵抗性は著しく弱い。

3. *S. rouxii*, *T. sake*, *T. versatilis* および *T. etchellsii* はそれぞれ耐塩型、好塩型で、醤油諸味の食塩濃度に相当する15~20%でも生育がはなはだ良好であるこ

とから、諸味中では特に大きな影響力をもつことが考えられる。

4. いずれも好塩型の生育を示す *T. versatilis* 73株と、*T. etchellsii* 8株とを用い、糖類醱酵能に対する食塩の影響を検討した結果、食塩濃度が高くなる程、醱酵が抑えられるという一般性が認められたほか、20~25%の高濃度においても醱酵力を持ち、徐々に緩慢な醱酵を続ける耐塩型の醱酵性が見られた。しかし、*T. versatilis* のサッカロース醱酵は、幾分好塩型であることと、醱酵量が著しく低いことが特徴で、この酵母のサッカロース醱酵が特異であると考えられる。また、*T. etchellsii* のグルコース醱酵性は、食塩濃度が3~5%の場合に特によい好塩型であることが認められた。

5. これらの特性から、*T. versatilis* および *T. etchellsii* はともに醤油諸味の後熟酵母として重要な影響を与えるものと考えられる。

第3章 *Torulopsis versatilis* の糖類醱酵性

前章において、*T. versatilis* はグルコース、マルトースの醱酵能にくらべてサッカロース醱酵能が弱く、醱酵によって生ずるCO₂の最高量が、グルコースの場合、対始糖理論値の70%以上に達するのにくらべ、サッカロースの場合はわずかに30%前後に過ぎないことが共通して認められた。この原因としては、1) インベルターゼに欠陥があるのか、または、2) この酵母が好塩型ということから、食塩の存在、ないしは滲透圧が影響しているのではないかと考えられる。

この章では先ず、食塩無添加の場合の糖類醱酵性を確め、次いで、食塩その他の塩類を種々の濃度に添加した場合と、pHを種々に調整した場合における糖類醱酵性から、醱酵能に対する塩類、滲透圧、およびpHの影響を検討して、この酵母の醱酵特性を明らかにしようとした。また、サッカロース、およびラフィノースの醱酵に関し、粗酵素液を調製してインベルターゼおよびメリビアーゼの活性をも検討した。

第1節 食塩無添加時における糖類醱酵性

前章、醱酵試験に用いた *T. versatilis* のうち、任意の1株を用い、食塩無添加の状態では種々の糖類の醱酵性を調べ、パーパークロマトグラフィーによって、醱酵液中の残糖検出を行なった。

実験方法

a) 供試菌株

帯広の醸造工場の諸味から分離した *T. versatilis* (No.

18C2株)を供試した。

b) 培地および試験法

前章，第2節におけると同様の方法によった。

c) 使用糖類

グルコース，ガラクトース，フラクトース，サッカロース，メリビオース，およびラフィノースの6種を用いた。

d) ペーパークロマトグラフィー²²⁰⁾

培養後の醱酵液と標準糖液とを東洋濾紙 No. 50 にスポットし，*n*-ブタノール：ピリジン：水=6：4：3による展開²²¹⁾を3度行なって充分に分離し，これを乾燥した後，アニリン水素フタル酸，110°Cで発色させ，Rf値を標準品と比較して同定した。標準に用いた糖類は醱酵に用いたと同一である。

結果および考察

a) 各種糖類の醱酵性

食塩無添加培地での醱酵試験結果を図6に示した。図は，6種の糖について，6日間にわたり測定した発生CO₂量をもって醱酵能を表わすグラフとしたものである。

グルコースの醱酵を見ると，培養後2~3日間で醱酵量はほぼ最高となり，CO₂発生量は対始糖理論値の約94%に相当した。ガラクトースの醱酵はややゆるやかに，ほぼ一定速度で上昇し，6日以降にはグルコースの最高醱酵量に匹敵する値を示すようになる。メリビオースの醱酵もガラクトースとほとんど同じ型の曲線で経過し，6日後に70%台となり，なお，ゆるやかに醱酵が続けられる。

サッカロースとラフィノースの場合は明らかにこれらとは異なる醱酵経過を示す。すなわち，醱酵は非常に悪く，特にサッカロースの場合は，4~5日ではほぼ一定値に

達して終了するが，その醱酵量は対始糖理論値の約22%に過ぎない。ラフィノースの醱酵もまた約25%で留まる。

また，フラクトースの醱酵は再三にわたる試験によっても全く認められなかった。

T. versatilis が ETCHELLS 氏²¹⁷⁾によって最初に記載された時には，グルコース，ガラクトース，サッカロース，マルトース，ラクトース，メリビオース，およびラフィノースを醱酵する，となっているが，LODDER 女史⁸¹⁾は再検討の結果，この酵母はメリビアーゼを持たず，したがってラフィノースを1/3醱酵するが屢々微弱であるとしている。しかし，著者が分離し，供試した菌株は，メリビオースをよく醱酵し，メリビアーゼ活性を有していることは明らかである。この点から見れば，ラフィノース醱酵が理論値の1/3にしか過ぎなかったことも，メリビアーゼによって遊離されたガラクトースが醱酵された結果として納得される。ここで特に注目されるのは，フラクトース醱酵性が全く認められなかったことである。フラクトースおよびマンノースが，その分子構造の類似性から，グルコースと同様に醱酵されるものであることは，すでに KLUYVER 氏^{222,223,224)}によって指摘され，LODDER 女史⁸¹⁾も分類上の検査項目には入れていない位であるが，著者の供試菌株によっては，グルコースがほとんど完全に醱酵されたにもかかわらず，フラクトースの醱酵は全く認められず，この条件ではこの糖の醱酵性はないものとせざるを得ない。したがって，サッカロースからインベルターゼによって遊離される2つの単糖類から，フラクトースは醱酵されずに残されることになり，理論的には，サッカロースは1/2醱酵の後止むことになる。供試菌の場合には，この価は

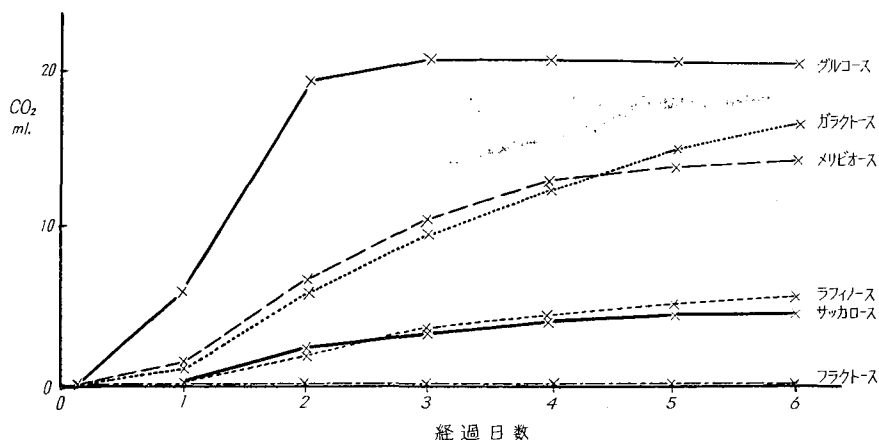


図6 *Torulopsis versatilis* (18C2) による糖類醱酵性

さらに低く、理論値の1/4にも満たない値となったが、これは、あるいは何らかの醗酵阻害をうけているものとも考えられる。ラフィノース醗酵についてこれを見ると、活性の高いメリビアーゼが作用してガラクトースとサッカロースを生成し、ガラクトースがほぼ完全に醗酵される形をとり、サッカロースが不完全な醗酵をうける、と解釈される。

b) 醗酵残液中の糖類のペーパークロマトグラフィー
前項 a) の醗酵残液のペーパークロマトグラムを図7に示した。図は、12日間培養後の醗酵液についての結果で、グルコース、ガラクトース、メリビオース各培地についてのそれぞれの糖のスポットが醗酵後完全に消失しているのが分る。ラフィノース培地においてはこれらと異なり、ラフィノースが消費された後、わずかなサッカロースのスポットと明瞭なフラクトースのスポットとを残しており、また、サッカロース培地におけるこの糖もかなり消失して、フラクトースを残すことが明らかに認められる。醗酵されなかったフラクトース培地における同糖のスポットは勿論明瞭不変である。

したがって、この酵母によれば、ラフィノースは主としてメリビアーゼによって分解され、さらに弱いインベルターゼが働いてフラクトースが分解されずに残ることが認められたといえる。

フラクトースの分解能がなく、グルコース、ガラクトースなどが分解されるという場合、代謝はペントース径路によっていることを示唆するものと思われる。しかし、SCARR 氏²⁵⁾の報告に見られるように、廃糖蜜から得た好滲透圧性酵母が、pH 5 付近でのみサッカロース分解能を示し、この糖を徐々に分解、同化する事実があり、さらにまた、糖代謝には無機塩類の影響も考えら

れることから、フラクトースあるいはサッカロース、ラフィノースの醗酵に関しては、食塩濃度や無機塩類、滲透圧、pH などの諸条件についての考慮が必要と思われる。

第2節 糖類醗酵性に対する塩類とその濃度および pH の影響

無塩培地を用いた実験で *T. versatilis* の1株には、フラクトース醗酵性のないことが認められたが、食塩濃度や滲透圧、pH、などの外界諸条件が醗酵性に影響することも考えられるので、食塩およびこれと同様に生理的に重要な塩化カリ、塩化カルシウムが、種々の濃度、種類の滲透圧において、糖類醗酵性に与える影響、種々の pH の影響を同菌株について調べ、諸条件におけるフラクトースの醗酵をさらに検討した。

実験方法

a) 使用菌株および試験糖類は、前節におけると同様である。また醗酵試験法は前章、第2節におけると同様である。

b) 滲透圧調整

培地の滲透圧調整には、食塩および塩化カリを、0.5, 0.8, 1.2, 2.0, 2.5, および 3.5 モル濃度の6段階に加えた場合 (VAN'T HOFF の式を適用して 27°C での滲透圧を概算すれば、ほぼ 25, 40, 60, 100, 123, および 172 気圧となる) のほか、参考として等モル濃度の塩化カルシウムをも用いた (滲透圧は、ほぼ 37, 60, 90, 148, 185, および 260 気圧となる)。いずれの場合も塩類無添加 (0 モル) を対照とした。

c) pH 調整

pH 調整は塩酸および苛性ソーダーを用いて行ない、pH 4.0, 4.8, 6.0, および 8.0 の4段階とした。

結果および考察

糖類醗酵性に対する塩類とその濃度の影響を調べた結果を図8に、pH 試験の結果を図9に、それぞれ示した。図中、x 軸上に経過時間をとり、y 軸上に醗酵量を生成 CO₂ 量で示し、各塩類濃度、または pH 毎に得られる曲線を y 軸上に並べてある。

a) 種々の塩類とその濃度の影響

(1) 食塩の影響

糖類醗酵性に対する食塩とその濃度変化による影響を図8について見ると、食塩を 0.5~1.2 モル濃度に添加した場合、グルコースの醗酵は、食塩無添加の場合とほぼ同等か、あるいは幾分良い程度で、ほとんど影響がなく、2.5 モル以上の食塩濃度では醗酵は抑えられてゆるやか

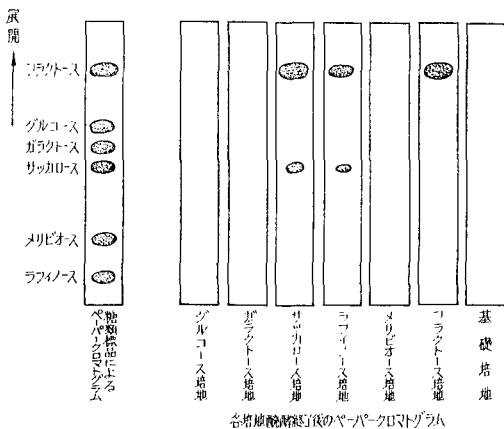


図7 各種糖類醗酵残液のペーパークロマトグラム [展開剤] n-ブタノール:ピリジン:水=6:4:3

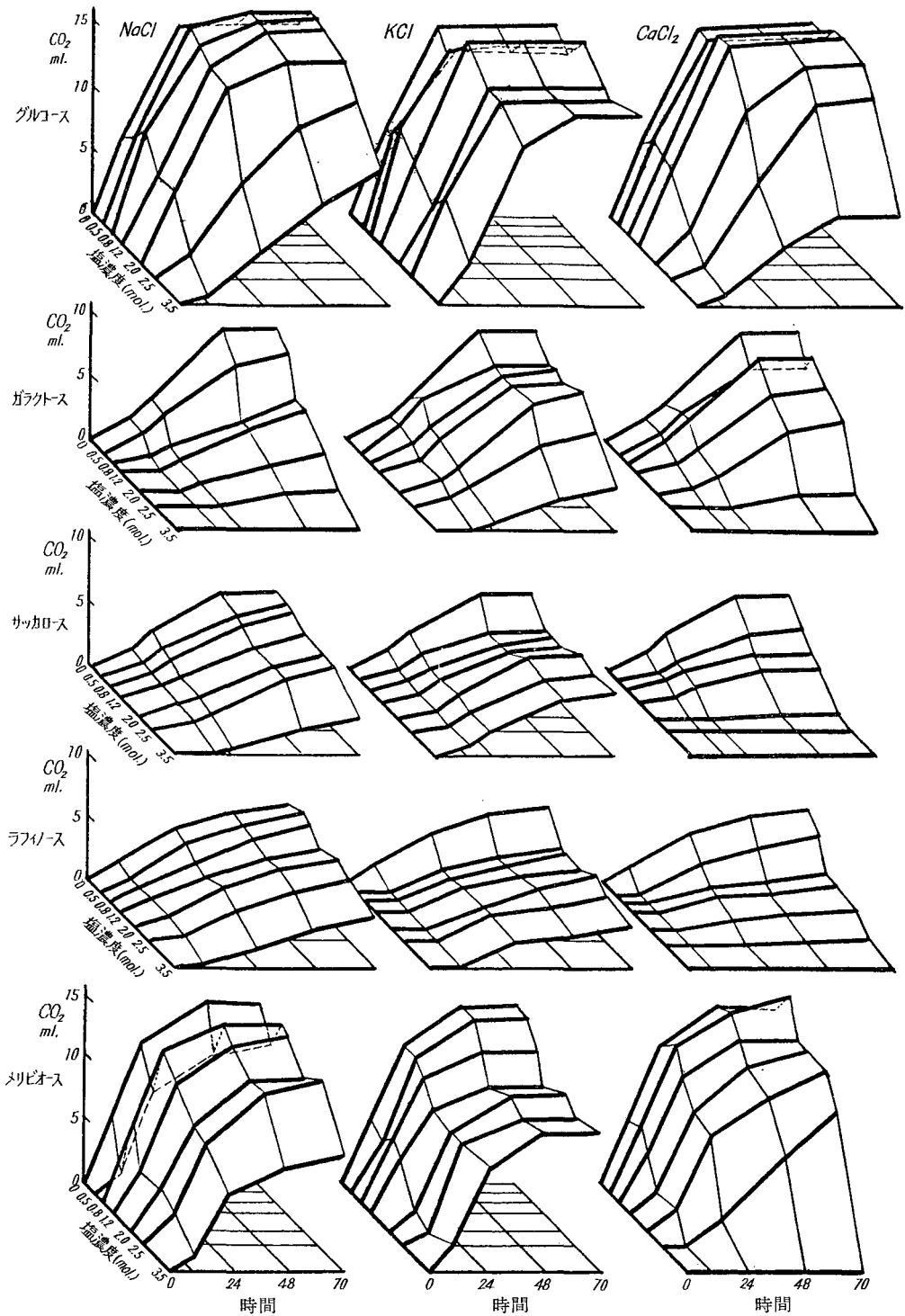


図8 *T. versatilis* (18C2) の糖類醗酵性に対する塩類とその濃度の影響

な曲線となるが、3.5モルの高濃度でも徐々に醗酵を続ける、全体として耐塩型か弱い好塩型を示した。ガラクトースの醗酵は、食塩濃度の増加とともに順次強く抑制され、3.5モルでは全く醗酵が認められなかった。サッカロースの醗酵は弱く、食塩濃度が高くなると抑えられ、低濃度では無添加の場合と同じか、やや良い位となって弱い好塩型とも見られるが、CO₂発生量はやはり低く、理論量の1/3以下であった。また、3.5モル添加の場合でも醗酵は徐々に続けられた。

ラフィノースの醗酵もこれと同じ型となった。メリビオースの醗酵性は前節において認められたが、その醗酵経過はグルコースの場合とほぼ同型となり、低濃度の食塩によってはほとんど抑制されず、3.5モル添加の場合でもかなり強い醗酵性を示した。

したがって食塩は、ガラクトース醗酵性に対して強い抑制効果を示すが、他の糖の醗酵性に対する影響は弱く、むしろ促進的に働らく場合もあり、3.5モルの高濃度でも徐々に醗酵が続けられることが確かめられた。

しかし、フラクトースの醗酵性は、いずれの食塩濃度においても認められなかった。

(2) 塩化カリの影響

塩化カリを添加した場合には、一般に無添加の場合よりも醗酵量がやや低下する。しかし、グルコース、サッカロース、およびラフィノースの醗酵では、塩化カリの濃度変化による影響をほとんどうけず、3.5モル添加の場合でも、無添加または0.5モル添加の場合とほぼ同程度の醗酵を示した。メリビオース醗酵においても、塩化カリ添加により醗酵量は幾分低下するが、1.2モル以上ではほとんど変わらず、また、ガラクトースの醗酵についても2.5~3.5モルの塩化カリ添加によって低下するが、なおかなりの醗酵能が認められ、低濃度ではほとんど影響されない。

塩化カリによる影響を食塩の場合と比較すると、等浸透圧の場合でも糖類醗酵性に対する影響は明らかに異なり、塩化カリは食塩ほど強い抑制作用を示さないことがわかる。このことは、この酵母の醗酵が浸透圧だけによって影響されるものでないことを示唆している。

フラクトースの醗酵性はこの試験においても全く認められなかった。

(3) 塩化カルシウムの影響

醗酵性に対し、塩化カルシウムは低濃度ではほとんど影響せず、ガラクトースの醗酵に対しても余り影響していない。しかし、高濃度添加の場合には著しく阻害し、特に3.5モル添加では、ガラクトース、サッカロース、

メリビオース、およびラフィノースの醗酵をほとんど、あるいは全く抑制した。全体としては、食塩による影響と類似した醗酵型となるが、高濃度での著しい阻害が特徴といえる。塩化カルシウムのような三元電解質による浸透圧は、食塩や塩化カリのような二元電解質による場合とくらべ、高濃度において著しく高まるので、この影響が強く出たのではないかと考えられる。

しかし、たとえば、0.8モルの塩化カルシウムによる影響と、この浸透圧(27°Cではほぼ60気圧)に相当する1.2モルの食塩あるいは塩化カリによる影響とをくらべた場合、ガラクトースの醗酵では、塩化カルシウムの場合の方が食塩の場合よりはるかに良いが、ラフィノース醗酵では塩化カルシウムより食塩の方がはるかに高い醗酵量を示していること、また、ラフィノース醗酵では塩化カルシウムより塩化カリの方がよいが、メリビオース醗酵では塩化カリより塩化カルシウムの方がはるかによいこと、などが認められ、醗酵に対する塩類の影響が浸透圧だけによるものでないことを、ここでも見ることができる。

フラクトースの醗酵性は、この場合にも認められなかった。

醗酵に対し、浸透圧が特に影響するものでないことは、CONWAY氏ら²²⁶⁾のいう“Osmotic barrier”の存在によっても考えられ、供試酵母の細胞がこれによって外界の高浸透圧から充分に保護され得るものと思われる。また、大西氏¹⁹⁸⁾が耐塩性の*S. rouzii*についての実験で述べているように、18%食塩含有培地に生育した細胞のイオン透過性が著しく変化増大し、これと等浸透圧の50%グルコース培地に生育したものでは、透過性の変化が見られず、単なる“Osmotic effect”によって透過性が増変するものでないことを指摘しており、このことが事実とすれば、浸透圧だけが醗酵を規制する要因ではない、と考えてよいようである。

一般に、微生物の活性は微量の金属イオンによって促進されるが、K⁺の場合は他のイオンにくらべて酵母細胞の“transporting system”に対する親和性が強い²²⁷⁾といわれ、さらにその出入は一定のバランスを保つようよく規制されている²²⁸⁾ことが分っており、塩化カリ添加の際の醗酵が高濃度においてほとんど影響をうけなかったのはこのためと考えられる。

また一方、PAYNE一派による海洋細菌の研究で、培地中のK⁺を増加すると細胞壁拡散率が増大することによって²²⁹⁾、また、Na⁺の増加によっては、とり込み機構の合成と機能に影響することによって、ともに、非イ

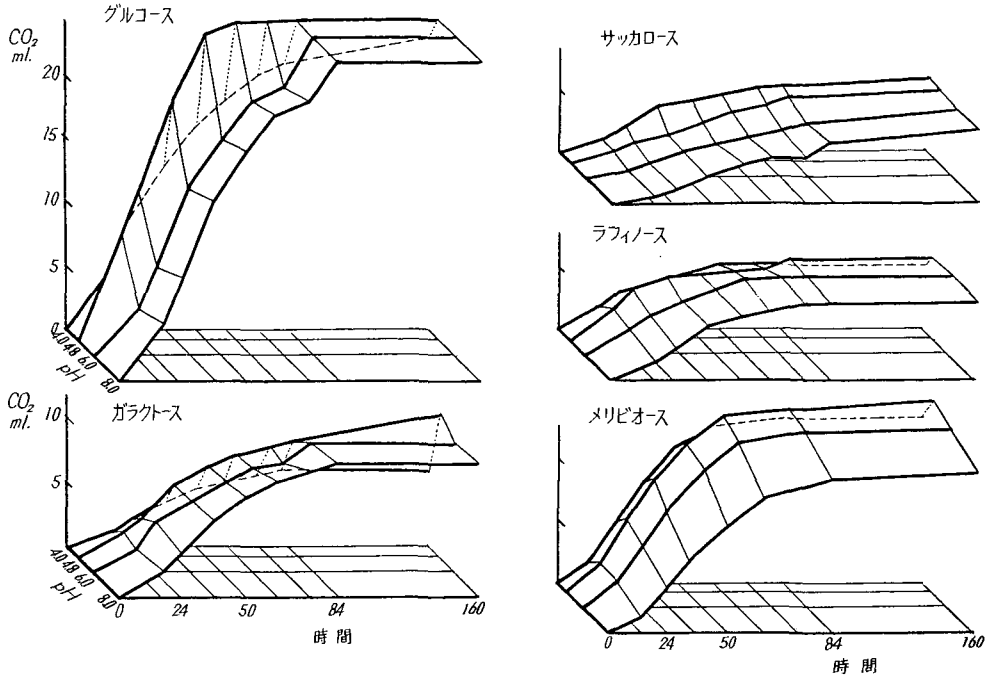


図9 *T. versatilis* (18C2) の糖類醱酵性に対する pH の影響

オン化物質の細胞透過量を増大することが明らかにされており、物質の醱酵代謝にこれらの金属イオンがそれぞれ重要な役割を果していることが考えられる。ただこの場合、その出入りがよく規制されている K^+ と異なり、 Na^+ の場合には、特に高濃度において阻害効果が現われたものであり、高濃度の塩化カルシウムの場合には、高い浸透圧が阻害作用を示したものと考えられる。

供試酵母が耐塩型であり、好塩性を有する点から見れば、これら金属イオンの賦活作用は当然考えられてよいわけであるが、フラクトースの醱酵性に関する限りいずれの場合にも全く認められず、この糖の醱酵性は、塩類や浸透圧とは無関係に欠如しているものと考えられる。

サッカロースおよびラフィノースの醱酵量がともに低かったことは、勿論このフラクトース醱酵性の欠如に起因するものであろう。しかし、その最高醱酵量は、いずれも対始糖理論値の26%程度に留まり、グルコースの最高醱酵量が76%であるのとくらべ、ほぼ1/3の値にしかすぎなかったことは、これらオリゴ糖の醱酵が、フラクトース醱酵能の欠如以外に、さらに何らかの阻害をうけていることを意味している。これらオリゴ糖の醱酵は、食塩あるいは塩化カリ添加の場合にくらべ、塩化カルシウム添加によって著しく低下しており、この塩による阻害が他の塩類によるよりも強いように思われる。

b) pH の影響

各糖類の醱酵性を pH 4.0, 4.8, 6.0, および 8.0 の4段階において調べた結果を図9について見ると、グルコース醱酵の場合、pH 4.0, 6.0, および 8.0 のいずれにおいてもほぼ同様の醱酵経過を示したが、pH 4.8 における醱酵は立上りも早く、醱酵量も最高値を示し、最適 pH はこの付近にあると考えられる。同様の傾向は、ガラクトース、メリビオース、およびラフィノースについても見られ、いずれも pH 4.8 付近に醱酵の最適点を有する。サッカロースの場合、醱酵の最適点は酸性となり、pH 4.0~4.8 を示した。この点から見てもラフィノース醱酵が主としてメリビアーゼによって行なわれていることが分る。

フラクトースの醱酵性は、この範囲の pH 変化によっても認められず、フラクトース醱酵性の欠如が pH によって影響されているとは考えられない。

第3節 粗酵素液によるサッカロースとラフィノースの分解

前節までに、供試した *T. versatilis* のサッカロースおよびラフィノース醱酵性が弱い原因の一つがフラクトース醱酵性の欠如によることが分り、ラフィノースの醱酵が主としてメリビアーゼによって行なわれると考え

られた。ここではさらに、この種酵母のインベルターゼ活性を確かめるため、代表的な3菌種について粗酵素液を調製し、これによる両糖分解と食塩による影響とを観察した。

実験方法

a) 供試菌株

前節において使用した *T. versatilis* 18C2 株と、同様に醬油諸味から分離し保存中の 1C2 および 26C5 を加え、3株を供試した。いずれも弱いサッカロース酸酵性を示すほか、18C2、1C2 はともにラフィノース酸酵性、26C2 はラフィノースをほとんど酸酵し得ないとされた菌株であり、3株ともにフラクトース酸酵は認められない。

b) 生菌体による酸酵試験法

第2章、第2節におけると同様の方法によった。

c) 使用糖類

サッカロースおよびラフィノースの2種を用いた。

d) 粗酵素液調製法

12%の甜菜糖蜜液を培地とした振盪培養により、大量の菌体を得た後、自己消化と凍結融解を繰り返す中性分別自己消化法²³¹⁾によって粗酵素液を調製した。この方法によるとβ-フラクトシダーゼ(インベルターゼ)とα-ガラクトシダーゼ(メリビアーゼ)の抽出が可能であった。

e) 粗酵素液によるサッカロースとラフィノースの分解

分解条件はpH 4.5(醋酸緩衝液)、35°C²³²⁾で、基質に食塩無添加の場合、および食塩を3, 5, 15%の各濃度に添加した場合について分解程度を調べた。分解程度は、分解によって遊離される還元糖量を SHAFFER-SOMOGYI 氏法²³³⁾で経時的に定量し、N/10 チオ硫酸ソーダ滴定値をもって分解程度とした。

結果および考察

a) No. 18C2 菌株の生菌体によるサッカロースおよびラフィノースの酸酵性と粗酵素液による同糖分解

生菌体による酸酵試験の結果を図10に、粗酵素液による糖類分解試験の結果を図11にそれぞれ示した。図中、 z 軸には食塩濃度をモル数で示し、 x 軸には経過時間を、 y 軸には、酸酵能の場合には、発生したCO₂ ml、また酵素活性の場合は生成還元糖量を N/10 チオ硫酸ソーダによる滴定 ml 数で示してある。

生菌体によるサッカロースとラフィノースの酸酵性は、前節までの結果と同様、耐塩型か弱い好塩型を示し、

酸酵量は低い値に留まった。

この菌株の粗酵素液によるサッカロース、ラフィノースの分解は、明らかに認められ、同時に、生菌体による酸酵性に見られたと同様の、やや中高の好塩型となっており、したがって、この酵母のインベルターゼは間違いなく存在し、その活性は、一定濃度の食塩の存在によってむしろ促進されるように見られる。

一般に、ラフィノースが酸酵される場合には、インベルターゼかメリビアーゼが作用するもので、インベルターゼが働くとフラクトースが遊離され、またメリビアーゼが作用するとガラクトースが遊離されて、これらがそれぞれ酸酵をうけることになる。供試菌の場合は、フラクトースの酸酵性はないのでラフィノースにインベルターゼだけが作用した場合にはCO₂は発生し得ない。しかし、サッカロースが酸酵されることから、インベルターゼを持っていることは確かであり、この酵母によるラフィノースからのCO₂発生は、インベルターゼとメリビアーゼがともに作用したことを示すものと考えることが出来る。

b) No. 1C2 菌株の生菌体によるサッカロースおよびラフィノースの酸酵性と粗酵素液による同糖分解

1C2 菌株の生菌体による酸酵性を図12に示したが、サッカロースの酸酵性は、5%の食塩存在下で最もよい明らかな好塩型を示した。しかし、ラフィノースの酸酵性は極めて悪く、食塩添加によって逆に著しい低下が認められた。

この菌株の粗酵素液による分解は、図13に示す通りで、明らかなサッカロース分解活性を有していたが、食塩による阻害が見られ、食塩濃度が高くなるとともに活性が低下し、生菌体による酸酵性とは異なる型となった。ラフィノースの分解はやはり食塩によって阻害される型となったが、この場合には生菌体による同糖酸酵性と似た型となっている。

したがって、この酵母のインベルターゼも健全ではあるが食塩による抑制作用をうけるように思われる。サッカロースの酸酵性が好塩型であったことは、分解されて生じたフラクトースとグルコースのうち、前者が酸酵されず、後者が好塩型の酸酵をうけたのではないかと考えられる。ラフィノース酸酵性に対する食塩の抑制作用が認められたが、この場合にはむしろメリビアーゼが働いて、ラフィノースから生じたガラクトースが嫌塩型の酸酵をうけたと見るべきで、この酵母の酸酵には、インベルターゼよりもメリビアーゼの影響が強く現われたもの

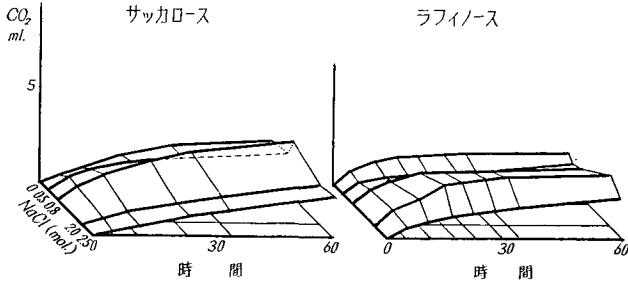


図10 *T. versatilis* (18C2) によるサッカロースおよびラフィノースの醗酵

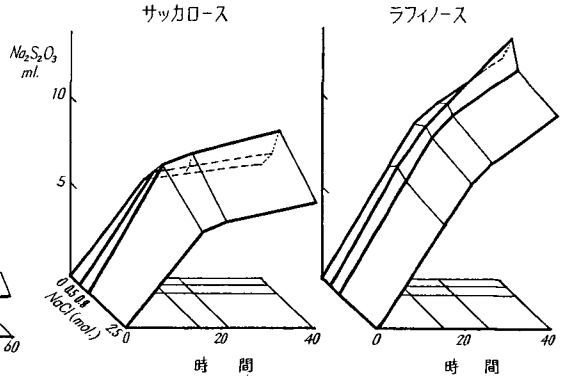


図11 *T. versatilis* (18C2) の粗酵素液によるサッカロースおよびラフィノースの分解

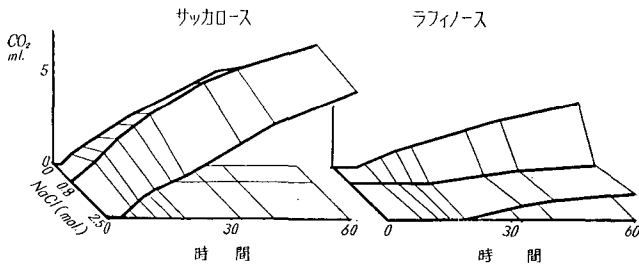


図12 *T. versatilis* (1C2) によるサッカロースおよびラフィノースの醗酵

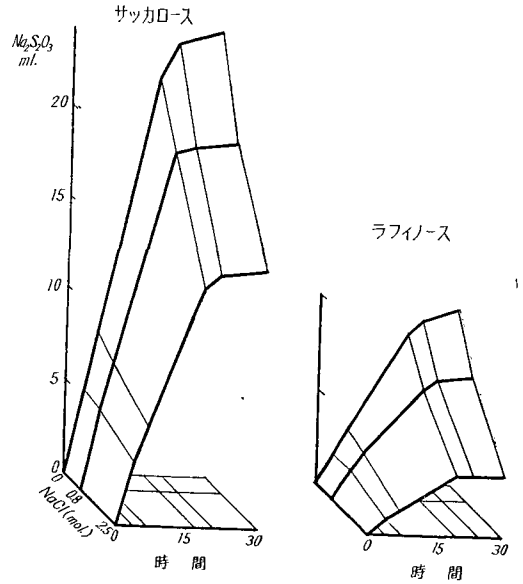


図13 *T. versatilis* (1C2) の粗酵素液によるサッカロースおよびラフィノースの分解

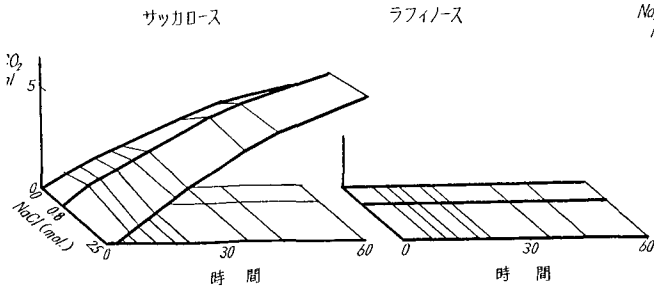


図14 *T. versatilis* (26C5) によるサッカロースおよびラフィノースの醗酵

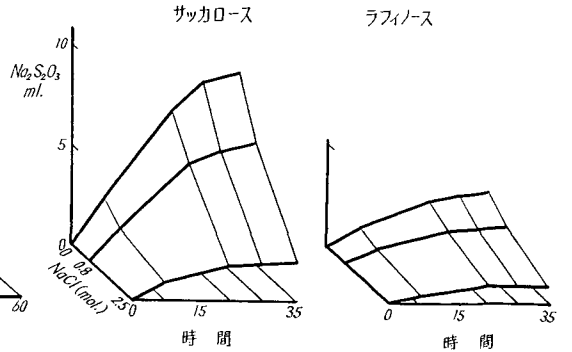


図15 *T. versatilis* (26C5) の粗酵素液によるサッカロースおよびラフィノースの分解

と考えられる。

c) No. 26C5の生菌体によるサッカロースおよびラフィノースの醱酵性と粗酵素液による同糖分解
26C5株の生菌体によるサッカロース醱酵も、図14に示すように好塩型となったが、ラフィノース醱酵性は全く認められなかった。

この菌株の粗酵素液によるサッカロース、ラフィノースの分解は図15に示したが、サッカロースの分解は1C2の場合と同様、弱い嫌塩型を示し、また、ラフィノース分解は、極く弱い嫌塩型となって明らかに認められた。いずれも醱酵型とは異なる型となった。したがって、この酵母もインベルターゼ活性を有することは明らかで、この作用によってサッカロースから生成されたグルコースとフラクトースのうち、後者が醱酵されず、前者が好塩型の醱酵をうけたと解釈される。一方、ラフィノースの場合は、インベルターゼ活性による分解生成物のフラクトースとメリビオースがそのまま残された形と見られるので、この酵母にはメリビアーゼ活性がないのではないかと考えられる。インベルターゼ自体は1C2の場合と同様、食塩により阻害作用をうけるようである。

これらのことから、*T. versatilis*とした菌株には、或程度の食塩の存在によって活性が高められる好塩性のインベルターゼを有するものと、食塩の存在によって活性を低下する嫌塩型のインベルターゼを有するものがあり、この酵素の性格は、生菌体による醱酵型と必ずしも一致するものでないことが分った。また、ラフィノース分解に際しては、菌株によってメリビアーゼがインベルターゼとともに作用する場合やメリビアーゼが強く作用する場合、さらにメリビアーゼ活性を全く示さないもののあることが推察され、この種の酵母では、これらの活性について、種々の型を含んでいるように思われる。

第4節 要 約

1. サッカロース醱酵性の弱かった好塩型の *Torulopsis versatilis* 1株について、食塩無添加で、グルコース、ガラクトース、フラクトース、サッカロース、メリビオース、ラフィノースの6種の糖類に対する醱酵性を調べたところ、この酵母は、グルコースと同様、ガラクトースとメリビオースをよく醱酵するが、サッカロース、ラフィノースの醱酵性は弱く、対始糖理論値のそれぞれ22%、25%程度にすぎず、さらに、この酵母によってフラクトースは全く醱酵されないことが明らかとなった。

醱酵残液についてのペーパークロマトグラフィーによっても、フラクトースは醱酵されずに残されることが

確かめられた。

2. 食塩、塩化カリ、塩化カルシウムを種々の濃度(0, 0.5, 0.8, 1.2, 2.0, 2.5, 3.5モル)に加え、塩類、滲透圧を変えた状態で、またpHを種々(4.0, 4.8, 6.0, 8.0)に調整した状態で、グルコース、ガラクトース、フラクトース、サッカロース、メリビオース、およびラフィノースの醱酵性を調べた結果、次のことが分った。

a) 基質に塩類を添加した場合、醱酵性は弱い好塩型か、ほぼ耐塩型となったが、食塩が高濃度で醱酵を抑制したのに反し、塩化カリは、ほぼ同じ滲透圧の場合でも特に強い影響を示さず、また塩化カルシウムを添加した場合でも、ほぼ等滲透圧の食塩および塩化カリの場合にくらべて醱酵量が明らかに高い場合と低い場合とがあつて、一定した傾向を示さず、滲透圧だけが醱酵を規制する要因とは考えられない。

b) サッカロースの醱酵はpH 4.0, 4.8において最もよく、その他の糖類では、いずれもpH 4.8において最高の醱酵量を示し、それぞれ醱酵の最適pHはこの範囲にあると思われる。

c) フラクトースの醱酵性は、試験した諸条件のいずれにおいても認められず、したがってこの酵母によってはフラクトースは醱酵されないものと考えられ、このことがサッカロース、ラフィノースの醱酵性の弱い主な原因と考えられる。

3. フラクトース醱酵性をもたない *T. versatilis* 3株を用い、これらのインベルターゼ活性を確かめるため、粗酵素液を調製してサッカロースとラフィノースの分解と食塩による影響を調べた結果、3菌株ともにインベルターゼは存在することが確かめられた。しかし、その挙動から、食塩によってある程度活性の高まる型と、阻害される型があるほか、ラフィノースの醱酵に際しては、菌株によってインベルターゼとメリビアーゼが同様に作用する場合、メリビアーゼ活性がより強く作用する場合、あるいは、メリビアーゼ活性がない場合、などのあることが考えられた。

第4章 醤油諸味酵母のフラクトース醱酵性と同化性

前章までに醤油諸味の熟成に重要と思われる *Torulopsis versatilis* が、サッカロースとラフィノースの醱酵性が弱く、そのうちの1株について精査したところ、フラクトースを分解する能力がなく、したがって、この糖を醱酵も同化もできないことが分り、これがこの弱さの主な原因と考えられた。

グルコースを醗酵してフラクトースを醗酵し得ないということは、酵母の場合、例を見ないことである。そして、これが *T. versatilis* の特性であるのか、好塩型酵母に共通した性質であるのか、また、醤油諸味酵母に特有の性格なのかどうか、などは、生態学的に興味ある問題であり、この種酵母の実態を知る上にも重要なことと思われるので、第1章において、醤油諸味から同時に分離した各種酵母を用い、グルコースおよびラフィノースの醗酵能を確かめ、さらに両糖の同化能の有無について検討した。

第1節 醗酵性および同化性試験

実験方法

a) 供試菌株

第1章において、分離し保存中の菌株のうち、醤油の主醗酵および後熟に関係あると思われる酵母を中心として、表9に示すような5属18種、194株を選んで供試した。

b) 醗酵試験法

前章におけると同様の方法によったが、食塩無添加の場合と、5%添加の場合とについて試験した。

表9 フラクトースの醗酵性および同化性試験菌種および菌株数

菌種名	菌株数
<i>S. cerevisiae</i>	2
(<i>T. sake</i>)	35
<i>S. rouxii</i>	60
<i>S. fructuum</i>	3
<i>S. mellis</i>	4
<i>H. anomala</i>	2
<i>D. halotolerans</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	2
<i>C. guilliermondii</i>	3
<i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. solani</i>	1
<i>T. gropengiesseri</i>	16
<i>T. bacillaris</i>	2
<i>T. famata</i>	3
<i>T. versatilis</i>	31
<i>T. anomala</i>	1
<i>T. etchellsii</i>	11
<i>T. magnoliae</i>	13
	194

c) 同化試験法

LODDER 女史ら³¹⁾の方法にしたがい、液体培地により試験した。すなわち、硫酸アンモニウム0.5%、磷酸一カリ0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カルシウム0.01%、食塩0.01%、酵母エキス0.05%の組成の液体培地を用い、これにさらに食塩を添加しないものと5%添加したものとを用意し、これを試験管に分注して滅菌し、これに、濾過除菌したグルコースまたはフラクトースを0.5%の濃度となるように無菌的に加え、若い前培養から調製した $10^2 \sim 10^3$ cells/mlの供試酵母懸濁液を1滴宛接種し、27°Cで培養して、10日間にわたり濁度を測定して生育度とした。濁度の測定には、島津製作所製光電比色計 DF-II 型 (630 m μ) を用いた。

結果および考察

同化性の試験において、食塩無添加の場合の生育がかなり悪い菌種もあったが、全体として、醗酵性および同化性は、食塩添加、無添加のいずれにおいてもほぼ同じ傾向を示した。表10には、食塩無添加の場合の結果を一括して示した。表中には、各種酵母の供試菌株数と、グルコースおよびフラクトースの醗酵性または同化性の認められた菌株数を示してある。

表10 分離酵母のフラクトースおよびグルコースの醗酵性および同化性

菌種名	使用菌株数	醗酵菌株数		同化菌株数	
		グルコース	フラクトース	グルコース	フラクトース
<i>S. cerevisiae</i>	2	2	2		
(<i>T. sake</i>)	35	35	35		
<i>S. rouxii</i>	60	60	58		
<i>S. fructuum</i>	3	3	3	3	3
<i>S. mellis</i>	4	4	0	4	0
<i>H. anomala</i>	2	2	2	2	2
<i>D. halotolerans</i>	3	3	3	3	3
<i>C. tropicalis</i>	2	2	2	2	2
<i>C. guilliermondii</i>	3	3	3	3	3
<i>C. parapsilosis</i>	2	2	2	2	2
<i>C. solani</i>	1	1	1	1	1
<i>T. gropengiesseri</i>	16	16	0	16	0
<i>T. bacillaris</i>	2	2	0	2	0
<i>T. famata</i>	3	3	0	3	0
<i>T. versatilis</i>	31	31	2	31	0
<i>T. anomala</i>	1	1	0	1	0
<i>T. etchellsii</i>	11	11	1	11	0
<i>T. magnoliae</i>	13	13	2	13	0

この中で、*S. rouxii* と *S. cerevisiae* およびその不完全型の *T. sake* の3種を含む97株は、諸味の醸酵に関与する、いわば主醸酵酵母群であるが、すべてグルコースおよびフラクトース両糖の強い醸酵性と同化性を示した。

その他の *Saccharomyces* 属酵母のうち、*S. fructuum* についても、両糖を良く醸酵、同化することが認められた。しかし *S. mellis* の場合は、グルコースに対して弱い醸酵性、同化性を示したにとどまり、フラクトースに対しては醸酵も同化もしないことが分った。

Hansenula, *Debaryomyces* および *Candida* 各属酵母はいずれもグルコース、フラクトースをとともによく醸酵、同化した。

T. sake 以外の *Torulopsis* 属酵母77株は、諸味の熟成に関与すると思われる酵母を含んでいるが、このうち、*T. anomala* が幾分異なっており、フラクトースの醸酵性がなく、同化性は極く微弱と判断された以外は、供試した *Torulopsis* 属酵母はすべてフラクトースの醸酵性も同化性も持たないことが明らかとなった。

フラクトース分解性を示さなかった *S. mellis* および *Torulopsis* 属酵母は、いずれも食塩に対する抵抗性があり、*S. mellis*, *T. gropengiesseri*, *T. versatilis*, および *T. etchellsii* が好塩型、*T. bacillaris*, *T. famata*, および *T. magnoliae* が耐塩型、のそれぞれ生育を示し、さらに、*S. mellis*, *T. bacillaris*, *T. versatilis* および *T. etchellsii* については40~60%の高濃度糖液にも生育することが認められ、いずれも抗滲透圧性という共通性をもっている。

したがって、*S. rouxii* と *S. cerevisiae* および *T. sake* の主醸酵酵母群と、*Hansenula*, *Debaryomyces* および *Candida* に属する供試酵母がすべてグルコースとフラクトースの醸酵性および同化性を示したのに反し、*S. mellis* や、特に後熟に関係あると見られる *Torulopsis* 属酵母など抗滲透圧性の酵母はすべて、グルコースを醸酵するがフラクトースを醸酵も同化もしないことが明らかとなった。さらにまた、前章で、*T. versatilis* の1株に認められたフラクトース非分解性という特殊な性格が、供試した *T. versatilis* すべてに共通した性格であることが分ったばかりでなく、抗滲透圧性の *S. mellis* や *Torulopsis* 属酵母、特に諸味熟成に関与すると見られる酵母全体についても認められる性格であることが明らかになったわけで、*S. rouxii* を中心とする主醸酵酵母群が高いフラクトース分解能を有し、*T. versatilis*, *T. etchellsii* を主体とし、品質に大きく影響すると見ら

表11 分離酵母の生育区分

菌種名	硝酸カリ同化性菌種	フラクトース同化性菌種	10%食塩培地に生育できる菌種	フラクトース同化性で10%食塩培地に生育できる菌種	硝酸カリ同化性で10%食塩培地に生育できる菌種
<i>S. cerevisiae</i> (<i>T. sake</i>)		■	■	■	
<i>S. rouxii</i>		■	■	■	
<i>S. fructuum</i>		■	■	■	
<i>S. bisporus</i>		■	■	■	
<i>S. mellis</i>	■				■
<i>H. anomala</i>	■	■	■	■	■
<i>H. subpelliculosa</i>		■	■	■	
<i>D. halotolerans</i>		■	■	■	
<i>C. tropicalis</i>		■	■	■	
<i>C. guilliermondii</i>		■	■	■	
<i>C. parapsilosis</i>		■	■	■	
<i>C. solani</i>		■	■	■	
<i>T. gropengiesseri</i>			■	■	
<i>T. bacillaris</i>			■	■	
<i>T. famata</i>			■	■	
<i>T. versatilis</i>	■		■	■	■
<i>T. anomala</i>			■	■	
<i>T. etchellsii</i>	■		■	■	■
<i>T. magnoliae</i>			■	■	
<i>T. nodaensis</i>	■		■	■	■
<i>Rh. mucilaginoso</i>		■	■	■	
<i>Sp. roseus</i>	■	■	■	■	

れる後熟酵母群が、フラクトースを全く分解し得ないということは甚だ興味深いことであり、諸味酵母の生態を見る上で重要な鍵となるものと考えられる。

ここでフラクトースの同化性をも含めた幾つかの特性から北海道産醤油諸味酵母を見ると、表11のようになる。すなわち、各菌種について、10%の食塩に対する抵抗性の有無、フラクトース同化性の有無、および硝酸カリ同化性の有無、によって区分すれば、先ず、10%の食塩に抵抗性をもつものとしては、*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis* の各属酵母があり、このうちでフラクトース同化性のものとしては *S. mellis* を除いた、*S. rouxii* および *S. cerevisiae* とこの不完全型の *T. sake* を含む *Saccharomyces* 属酵母群と、*Hansenula*, *Debaryomyces* 各属酵母があり、フラクトース同化性をもたないものとしては、ほとんどが硝酸カリ同化性の *Torulopsis* 属酵母群が含まれ、この中には品質を左右する後熟酵母として重要と見られる *T. versatilis* や *T. etchellsii* がある。耐塩性のこれら酵母のうちで、菌株分離試験において出現頻度が非常に小さく、しかもその分布が地域的にも限られていた *S. mellis* や *Hansenula*, *Debaryomyces* を別とすれば、諸味の主醸酵に

関与する *S. rouxii* などの *Saccharomyces* 属酵母群はフラクトース同化性で硝酸カリ非同化性の一類として、また後熟に関与すると見られる *T. versatilis*, *T. etchellsii* などの *Torulopsis* 属酵母群はフラクトース非同化性で硝酸カリ同化性の一類として、それぞれ分別することが出来ると考えられる。

第2節 要 約

1. *T. versatilis* の1株に認められたフラクトースの非分解性が、普遍的なものかどうかを確認するため、醤油諸味から同時に分離した酵母のうち主なもの5属18種、194株について、グルコースとフラクトースの醗酵性と同化性を調べた。その結果、次のことが明らかとなった。

a) *S. rouxii* および *S. cerevisiae* とその不完全型の *T. sake* の3種は、グルコースおよびフラクトースの強い醗酵性と同化性を示した。*S. frutumum* もまた両糖をよく醗酵、同化した。*S. mellis* はグルコースの弱い醗酵性、同化性を示したが、フラクトースを醗酵も同化もしなかった。

b) *Hansenula*, *Debaryomyces* および *Candida* 属酵母は、いずれも、グルコース、フラクトースをよく醗酵し同化した。

c) *Torulopsis* 属酵母のうち、*T. anomala* はフラクトースの醗酵性がなく、極く弱い同化性を示したが、これと *T. sake* を除いた他のすべての *Torulopsis* は、グルコースを醗酵、同化するがフラクトースの醗酵性も同化性も示さなかった。

2. 耐塩性または好塩性で、後熟酵母として諸味品質に影響すると見られる *Torulopsis* 属酵母が、特異的にフラクトースの分解能を示さなかったことから、この特性を用いて、諸味の主醗酵酵母群と後熟酵母群とを分別することが可能と考えられた。

第5章 *Saccharomyces* 属および *Torulopsis* 属酵母群の分別計数

第1章および第2章において、北海道産醤油諸味中の酵母に2つの大きなグループがあり、その一つはいわゆる醤油酵母とされる *S. rouxii* と、諸性質がこれに極めて似ている *S. cerevisiae*、およびこの不完全型である *T. sake* の3種を含むいわば *Saccharomyces* 属酵母群で、耐塩性強く、諸味の主醗酵に関与するもの、他の一つは、*T. versatilis*, *T. etchellsii* を主体とする好塩性の *Torulopsis* 属酵母群で、後熟に関与すると考えられるもの、であることが分った。さらに、これらの生理的性質を詳細に調べたところ、*Saccharomyces* 属酵母群は、いずれもフラクトースをよく同化するのに反し、好塩性の *Torulopsis* 属酵母群は、いずれも硝酸カリ同化性であるほか、フラクトースを醗酵も同化もしないという特性のあることが分った。

したがって、耐塩性と、フラクトース同化性の有無、および硝酸カリ同化性の有無、によって適当に選択出来れば、これら主要な両群を分別計数することが可能となり、さらに、諸味中における主要酵母群の消長を把握、諸味品質との関連性を追究することが出来ると考えられたので、これらの特性を基礎とした両群の選択培地を考案し、分別計数の可能性を調べた。

諸味の熟成に特に重要と考えられる *T. etchellsii* については、さらにその特性を精査し、その消長を追究するための方策をも検討した。

第1節 選択培地とその適用

前章までに明らかになった、1) 主醗酵および後熟に関与する酵母群が、いずれも強い耐塩性を有しているため、10%程度の食塩濃度によって耐塩性のない他の酵母と区別出来ると考えられること、2) 主醗酵に関与する *Saccharomyces* 属酵母群がフラクトース同化性で、硝酸カリ非同化性であること、3) 後熟に関与すると思われる

表12 醤油諸味酵母の選択培地

培地名	組				成	
S	10% 食塩含有葡萄糖馬鈴薯寒天					
F	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%	KH ₂ PO ₄	0.1%	MgSO ₄ ·7 aq.	0.05%
	NaCl	10%	フラクトース	2%	寒 天	2%
N	KNO ₃	0.08%	KH ₂ PO ₄	0.1%	MgSO ₄ ·7 aq.	0.05%
	NaCl	10%	グルコース	2%	寒 天	2%

る *Torulopsis* 属酵母群がフラクトース非同化性で硝酸カリ同化性であること、の3点を利用し、LODDER 女史ら⁸¹⁾の同化試験培地を参考として、表12の様なS-, F-, N-培地の3種を選択用に考案し、これを試験することとした。すなわち、S-培地は、10%の食塩を含むPGagarで、これにより耐塩性の酵母が計数でき、食塩10%と、窒素源として硫酸アンモニウム、炭素源としてフラクトースを含むF-培地では、主として *Saccharomyces* 属酵母群が生育し、また、食塩を10%含み、窒素源として硝酸カリ、炭素源としてグルコースを加えたN-培地では、主として *Torulopsis* 属酵母群が生育し、それぞれ分別出来る筈である。

本節では、選択培地を純粋培養および諸味に適用し、両酵母群の分別計数の可能性を検討した。

I. 純粋培養への適用

実験方法

純粋培養として北海道産醤油諸味から同時に分離した *S. rouxii* (1C3₁), *S. cerevisiae* (16C4), *T. versatilis* (1C2), および *T. etchellsii* (1C3₂) の4菌株を用い、5%食塩を含むPGagar 斜面の前培養から菌体を取り、滅菌した生理食塩水に懸濁し、適宜稀釈して1ml 当り10²程度の細胞数とした稀釈液1ml 宛をペトリ皿に無菌的に注入した後、予め融解した選択培地を流し込み平板に固化した。平板は27°Cに7日間培養し、発育したコロニーを培地毎に計数した。

試験は、各菌株単独の場合と、4者を混合した場合、の5つの試験区について行ない、各試験区毎に3種の培地につき3枚宛の平行試験を行なった。

結果および考察

結果を表13に示した。各コロニー数は3枚の平行試験結果の平均値で示してある。4種の純粋培養を単独に、または混合して用いた場合、各培地におけるコロニーの発育はいずれもほぼ忠実な再現性を示し、これらの培地が *Saccharomyces* 属酵母群と *Torulopsis* 属酵母群とを

表13 選択培地による代表的醤油諸味酵母の分別計数

菌種 (接種細胞数)	コロニー数		
	S-培地	N-培地	F-培地
<i>S. rouxii</i> (90)	91	0	88
<i>S. cerevisiae</i> (90)	90	0	87
<i>T. versatilis</i> (110)	103	98	0
<i>T. etchellsii</i> (120)	113	109	0
4種混合	356	208	189

分別計数するための選択培地として充分使用し得ることを示している。因みに、選択培地に酵母エキスを添加して用いた場合には、各酵母の生育はよくなり、平板当りのコロニー数も増すが、選択性が悪くなる傾向が見られる。したがって、酵母エキス無添加培地を用いて充分と思われる。

II. 醤油諸味への適用

前項I. で適当と判断された選択培地を、実際の醤油諸味に適用し得るかどうかについて試験した。

実験方法

a) 試料

札幌市、福山醸造株式会社工場より、仕込時期を異にする1, 2, 3, 4, および5ヵ月経過の諸味を採取し、試料とした。

b) 試験法

諸味試料について稀釈平板培養を行ない、前項と同法により選択培地毎に分別計数した。

結果および考察

分別計数の結果を表14に示した。表には各月の試料毎に、S-, F-, N-培地、3種の選択培地により分別した

表14 醤油諸味中の酵母の分別計数

a) 1ヵ月経過諸味

選 択 培 地	S	F	N
選択培地上のコロニー数(×10 ³ /g)	1062	592.4	335

b) 2ヵ月経過諸味

選 択 培 地	S	F	N
選択培地上のコロニー数(×10 ³ /g)	10.8	5.0	4.5

c) 3ヵ月経過諸味

選 択 培 地	S	F	N
選択培地上のコロニー数(×10 ³ /g)	107.0	52.9	52.6

d) 4ヵ月経過諸味

選 択 培 地	S	F	N
選択培地上のコロニー数(×10 ³ /g)	45.8	20.9	24.2

e) 5ヵ月経過諸味

選 択 培 地	S	F	N
選択培地上のコロニー数(×10 ³ /g)	142.7	61.2	82.6

コロニー数を、諸味1g(湿重)当りの菌数で表わしてあり、各培地毎に3枚宛の平行試験を行なった結果の平均値で示してある。

各月試料の酵母菌数は、同一条件の醸造ではないので直接比較することは出来ないが、総体的に酵母数は1カ月諸味で多く、2カ月諸味で低くなった後、次第に増加するように思われる。また特に、1カ月後の若く未熟な諸味では *Saccharomyces* 属酵母群が多く、4, 5カ月後の諸味になると *Torulopsis* 属酵母群が多くなるという傾向が認められる。

これらの結果は、選択培地を用いたこの分別法が、諸味中における主要酵母群の大まかな消長を把握するのに甚だ有効であることを示すものといえる。

なお、N-培地、およびF-培地に発育したコロニーについては、その外観と細胞の形、大きさから *Saccharomyces* 型酵母か *Torulopsis* 型酵母かの凡その判定を行なったが、両培地においてそれぞれ多少の混入はあったものの、その割合は数%に過ぎず、大勢の判断には影響しないと考えられた。

また、*Saccharomyces* 属、*Torulopsis* 属酵母群以外の耐塩性のない雑酵母については、食塩無添加で、pH 4.2程度に乳酸酸性としたPGagarにより、同時に計数し、耐塩性両酵母群菌数を差引いた残りをもって菌数と考えたが、仕込時 10^4 cells/g 程度のものが、1カ月後 $1/10 \sim 1/1000$ に減少し、最初の1カ月以内にほとんどが消失してしまうものと見られる。

第2節 *Torulopsis etchellsii* の生育条件

第1ないし3章において、*T. versatilis* などの好塩性 *Torulopsis* 属酵母が熟成に関与するものであり、中でも *T. etchellsii* が後熟酵母として重要なことを指摘した。しかし、この酵母は、他の醤油諸味酵母にくらべて生育の悪いことが多く、培養条件がかなり厳密なもののように思われた。諸味中におけるこの種酵母の生育如何が品質に大きく影響すると思われるので、ここでは、この酵母の生育に適した温度や栄養条件を食塩濃度と関連付けながら検討した。

I. 温度の影響

T. etchellsii の生育と温度の関係を種々の食塩濃度において検討し、諸味の主要酵母群と比較した。

実験方法

a) 供試菌株

前節I.において用いたと同じ菌株を供試した。すな

わち、*T. etchellsii* (1C3₂) 1株のほか、対照として *S. cerevisiae* (16C4)、*S. rouxii* (1C3₁)、*T. versatilis* (1C2) 各1株、合計4株である。

b) 試験培地

糖濃度約11%の麴エキスをを用い、これを食塩無添加(0%)と、5および10%添加の3段階に調製し、それぞれ50ml宛を150ml容三角フラスコに分注、滅菌した。

c) 試験法

5%の食塩を含むPGagarで5日間培養した菌体を、滅菌生理食塩水に懸濁し、その一定量を試験培地に無菌的に接種した。接種後の菌数は1ml当り $10^5 \sim 10^6$ とした。接種したフラスコは、27, 32, 37, および45°Cの4段階で静置培養し、6日後の菌数をTHOMAの血球計数盤を用いて測定した。

結果および考察

結果を図16に示した。図は縦に *T. etchellsii* と *S. cerevisiae*、*S. rouxii*、および *T. versatilis* の順に、各温度、各食塩濃度毎の菌数の増加(右側)と減少(左側)を示してある。

この結果を見ると、45°Cではどの菌も全く生育せず、むしろ菌数減少の傾向が見られる。37°C以下について見ると、*S. cerevisiae*、*S. rouxii* などの主醸酵酵母群は、食塩の存在如何にかかわらず、よく生育、増殖するが、*T. versatilis* の場合は、食塩添加培地での生育はよいが、食塩無添加では生育が悪くなる傾向が認められ、27°, 32°, 37°Cと高温になる程この傾向が強くなる。*T. etchellsii* においても27°Cおよび32°Cの、比較的低温の場合に同じような傾向が見られ、食塩が存在すればかなりよく生育することが分った。しかし、この酵母だけは、食塩存在下でも37°Cでは全く生育出来ず、むしろ菌数が減少するという著しい特徴を示した。すなわち、4種の酵母は、食塩存在の如何にかかわらず、45°Cでは発育できないこと、37°C以下の場合、食塩無添加では、主醸酵を行なう *Saccharomyces* 属酵母群はよく生育するが、後熟に関係ある *Torulopsis* 属酵母群は、温度が高くなるほど生育が抑制されること、そして、食塩存在下では、*Saccharomyces* 属酵母群と *T. versatilis* は37°Cでもよく生育するが、*T. etchellsii* は全く生育し得ないこと、が明らかとなった。

T. etchellsii に関するこのような特性はまだ認められておらず、好塩性とも関連して甚だ興味深い現象と思われるが、このことはまた、醸酵管理の上からも無視できない問題であり、諸味品質向上のための一つの示唆を与えるものといえる。すなわち、諸味温度を比較的低温と

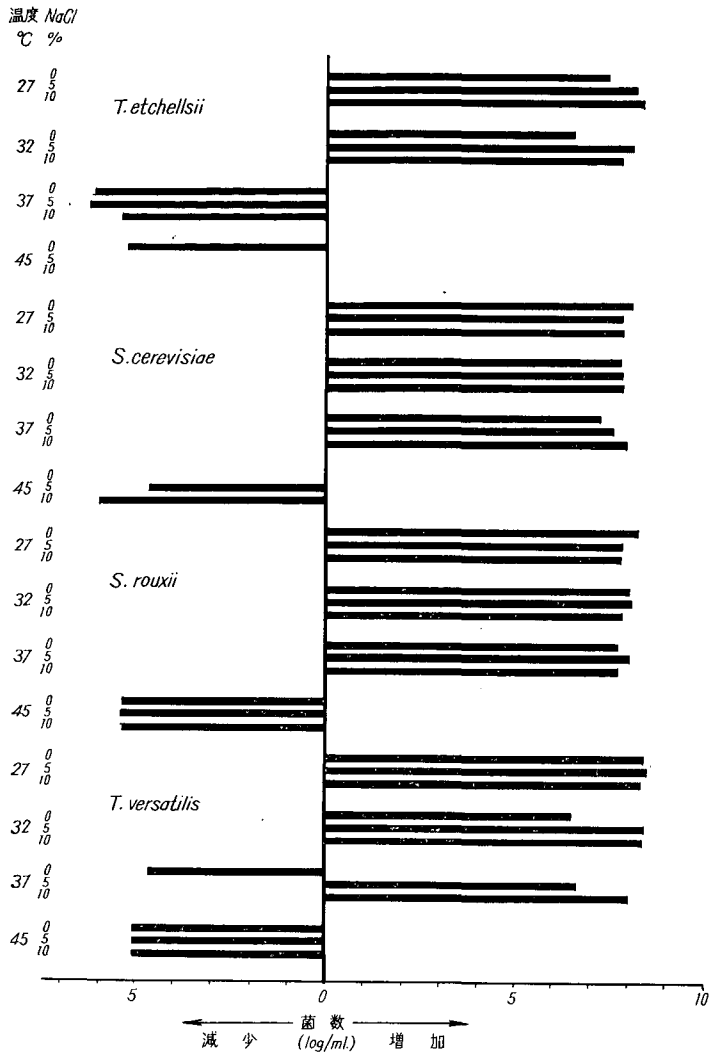


図16 醤油諸味主要4酵母の生育に対する温度と食塩濃度の影響

して醗酵管理を行なえば、後熟酵母として充分増殖する機会を *T. etchellsii* に与えることができるわけであり、この意味で温度管理に対する留意が必要である。また、この特性をも合わせて利用すれば、*T. etchellsii* は、主醗酵を行なう *Saccharomyces* 属酵母群とは勿論、後熟に関係ある *T. versatilis* とも区別して計数することが可能と考える。

II. 栄養源の影響

前項I.と同じく、*T. etchellsii* (1C3₂)を用い、食塩濃度と栄養源により、この酵母に好適な生育条件を検討した。

好塩性ないし耐塩性酵母の栄養要求に関しては、2,3の研究が報告されているに過ぎないが、ビオチンが必須であること^{234,235}、イノシトールが要求されること^{236,237}、ビオチン-メチオニン系が必要であること⁹⁴、などが分っている。また、一般に麴は糖분을供給するばかりでなく、種々の生育促進物質の供給源としても重要と考えられ、この意味から麴エキスは酵母の最良の栄養源の一つとされている。

この項では、これらを含めた各種栄養源の単独使用効果とともに、麴エキスを中心とした混合添加の影響をも観察した。また、特に *Saccharomyces* 属酵母群との関連性を明らかにする意味から、*S. cerevisiae*、*S. rouxii* の

自己消化液あるいは浸出液の影響についても検討した。

実験方法

a) 試験法

表 15 に示した基礎培地を小試験管に分注、滅菌後、これに濾過除菌、または瞬間滅菌したビタミン類その他の栄養源水溶液を、一定濃度となるように無菌的に添加し、酵母懸濁液 (10³ cells/ml) 1 滴宛を接種した後、27°C または 32°C に 7 日間培養し、濁度により生育程度を測定した。使用した栄養源は表 16 に示したように、ビタミン類 8 種のほか、麴エキス、市販酵母エキス、*S. cerevisiae* (16C4) および *S. rouxii* (1C31) の自己消化液ならびに浸出液、ペプトンなど 7 種を加えた 15 種で、単独、また

は混合して添加し、その効果を比較した。

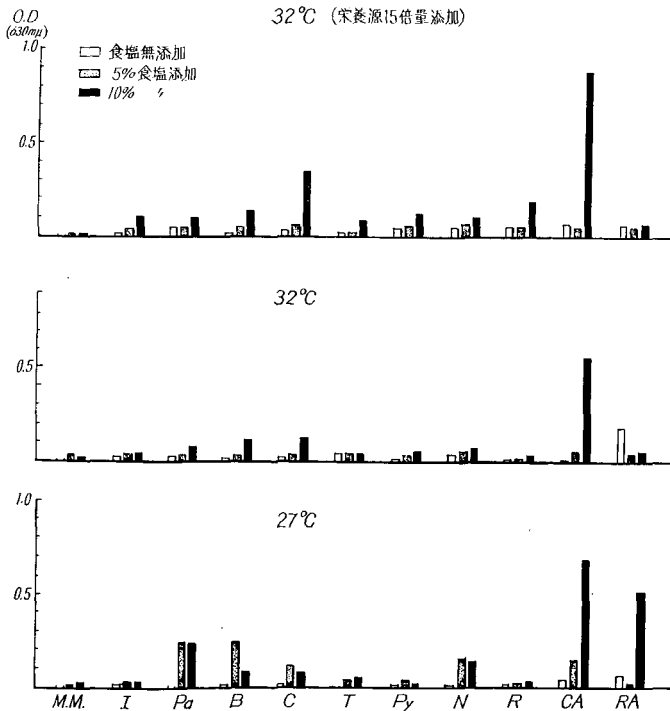
試験は前項におけると同様、食塩無添加 (0%) および

表 16 生育試験用ビタミン類その他の栄養源

栄 養 源	記号	使用濃度
ビタミン類		
イノシトール	I	4 mg%
パントテン酸-Ca	Pa	0.8
ビオチン	B	0.004
シスチン	C	0.4
チアミン塩酸塩	T	0.8
ピリドキシン塩酸塩	Py	0.8
ナイアシン	N	0.8
リボフラビン	R	0.4
そ の 他		
<i>S. cerevisiae</i> の自己消化液	CA	0.2 %
<i>S. rouxii</i> の自己消化液	RA	0.2
<i>S. cerevisiae</i> の浸出液	CE	0.2
<i>S. rouxii</i> の浸出液	RE	0.2
酵母エキス (粉末)	Y	0.1
麴エキス	K	1.0
ペプトン	P	0.2

表 15 生育試験用基礎培地

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7 aq.	0.05
CaCl ₂ ·2 aq.	0.01
NaCl	0.01
グルコース	1.0
pH 5.6	



- M.M. 基礎培地
- I. 基礎培地+イノシトール
- Pa. 基礎培地+パントテン酸-Ca
- B. 基礎培地+ビオチン
- C. 基礎培地+シスチン
- T. 基礎培地+チアミン塩酸塩
- Py. 基礎培地+ピリドキシン塩酸塩
- N. 基礎培地+ナイアシン
- R. 基礎培地+リボフラビン
- CA. 基礎培地+*S. cerevisiae* の自己消化液
- RA. 基礎培地+*S. rouxii* の自己消化液

図 17 *T. etchellsii* の生育に対するビタミン類および *Saccharomyces* 属酵母自己消化液の影響

5, 10% 添加の3段階で行ない、すべて2本宛の平行試験とした。

濁度は島津製作所製光電比色計 CFD-II 型, 630 m μ で測定した。

b) 酵母の自己消化液調製

振盪培養後の菌体を遠沈して集め, 湿重量で約10% (w/v) 濃度の水懸濁液をつくり, これを55°Cに24時間放置して得た自己消化液を濾過除菌して供試した。

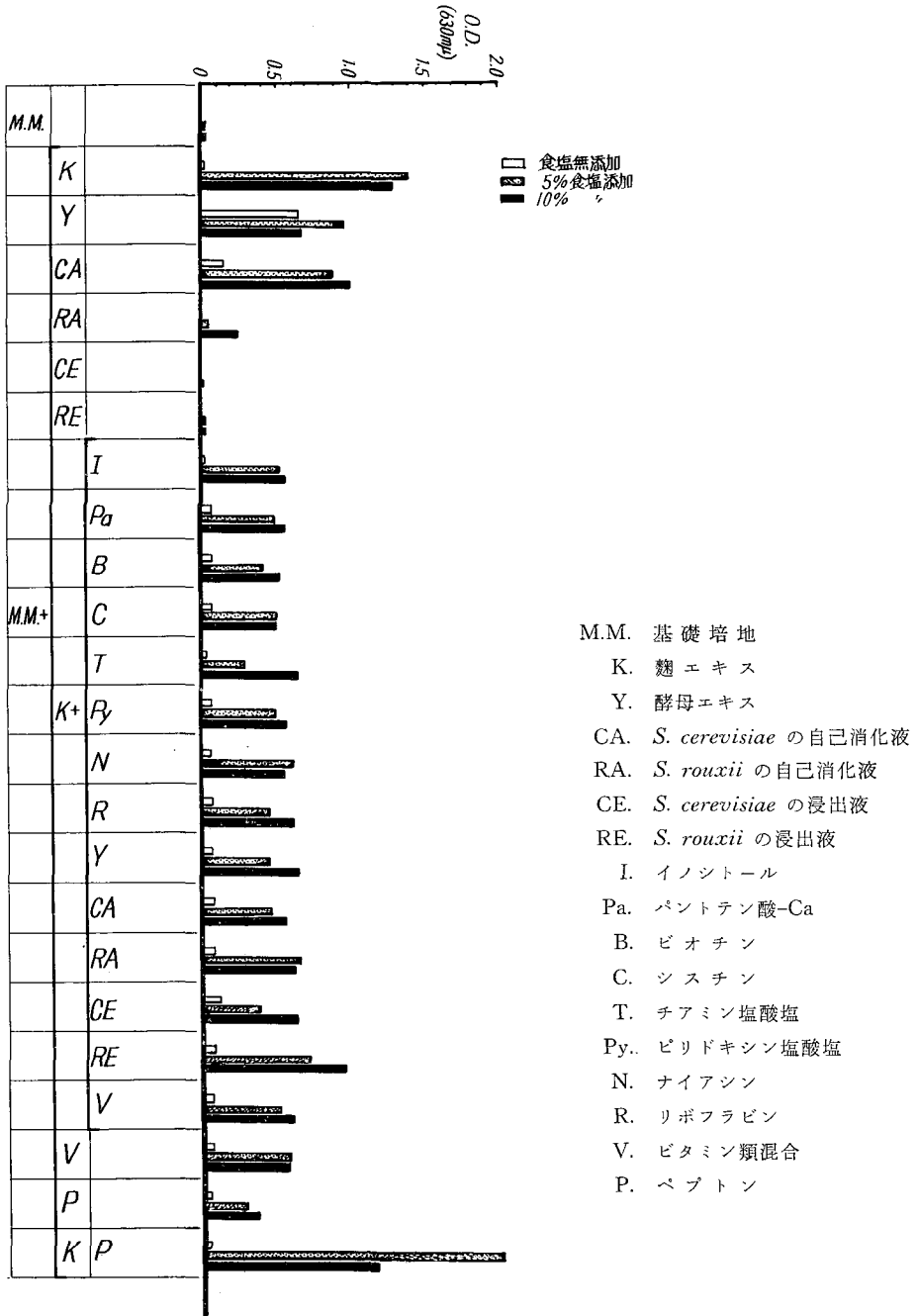


図18 *T. etchellsii* の生育に対する各種栄養源の影響

c) 酵母の浸出液調製

振盪培養し遠沈した菌体を自己消化液調製と同様約10% (w/v) の水懸濁液とし、110°Cで5分間滅菌したものを浸出液とした。

d) その他

麴エキスは、米麴1kgに4ℓの水を加え、55°Cに保温、糖化し、これを濾過、110°Cで5分間滅菌して使用した。

酵母エキスは、市販酵母エキス(オリエンタル酵母工業株式会社製)、ペプトンはポリペプトン(第五栄養化学株式会社製)を使用した。

結果および考察

1. 単独添加の影響

ビタミン類などを単独に添加した培養結果を図17に示した。図は、食塩無添加および5、10%添加の場合について左から基礎培地の場合(M.M.)、これにイノシトール(I)、パントテン酸カルシウム(Pa)、ビオチン(B)、シスチン(C)、チアミン塩酸塩(T)、ピリドキシン塩酸塩(Py)、ナイアシン(N)、リボフラビン(R)、*S. cerevisiae*の自己消化液(CA)、および*S. rouxii*の自己消化液(RA)をそれぞれ添加した場合の*T. etchellsii*の生育程度を濁度で示したもので、上、中段、2つのグラフは32°C、下段は27°C培養の場合、また、上段の栄養源は、中、下段の15倍量を添加してある。

グラフによってこの結果を見ると、一般にビタミン類など栄養源を添加することによって生育はよくなり、その効果は食塩の存在によってさらに強まることが分る。栄養源の濃度を増加したことによって効果の増したものとして、シスチン、リボフラビンなどがあり、低濃度(中、下段)の場合では、比較的低温の27°C培養の方が効果大きく、パントテン酸カルシウム、ビオチン、ナイアシンにおいて特に大きいようである。これらのビタミン類にくらべて、主醸酵酵母の自己消化液は著しい生育促進効果を示し、特に*S. cerevisiae*のそれは、10%食塩添加時に甚だ有効であることが認められた。また*S. rouxii*の自己消化液が、低温の27°C培養において大きな効果を示したことは著しい特徴として注目される。すなわち、*T. etchellsii*は、食塩が存在した場合、栄養要求度が高まるが、主醸酵酵母の細胞内容物によってその生育を強く促進されることが明らかとなり、しかも、*S. rouxii*の自己消化液の場合には比較的低温で効果が大きいことが分った。したがって、*T. etchellsii*が諸味中で増殖するためには、主醸酵酵母を充分繁殖させた後、温度をやや低目に保つことが効果的に思われる。

2. 混合添加の影響

麴エキスを主体とし、他の栄養源を混合添加してその効果を27°Cで調べた結果を図18に示した。図は上から基礎培地の場合(M.M.)、これに麴エキス(K)、酵母エキス(Y)、*S. cerevisiae*および*S. rouxii*の自己消化液(それぞれCA, RA)と浸出液(CE, RE)を各単独に加えた場合、麴エキスと各ビタミン類をともに添加した場合、麴エキスと、酵母エキス、自己消化液および浸出液をそれぞれ混合して添加した場合、麴エキスとビタミン類混合液(V)をともに加えた場合、ビタミン類混合液添加の場合、ペプトン(P)を加えた場合、麴エキスとペプトンをともに加えた場合、など24種の培地における生育程度を食塩濃度(0, 5, 10%)ごとに示してある。

この結果、食塩無添加の場合には酵母エキスに著しい促進効果が認められた。食塩添加培地においては、基礎培地(M.M.)、浸出液添加(CE, RE)を除いて、いずれも生育促進効果を示したが、中でも麴エキス(K)、酵母エキス(Y)、自己消化液(CA, RA)、麴エキス-ペプトン混合添加(K-P)などは促進効果の大きいことが分った。しかし、麴エキスにさらにビタミン類その他を添加した場合は、ビタミンなど単独添加効果(前項1、図17)にくらべてはるかによいが、麴エキス単独の添加効果よりもかなり低く、結果的にはむしろ麴エキスの促進効果を抑えた形となった。ペプトンは食塩存在下で麴エキスと混合添加することによって著しい促進効果を示した。

これらのことから、*T. etchellsii*の生育に対し、食塩無添加の場合には酵母エキスが促進効果を示し、食塩存在下では、酵母エキス、主醸酵酵母群の自己消化液および麴エキスに強い促進効果があり、さらに麴エキスとペプトンの混合添加が甚だ有効なことが明らかとなった。

主醸酵酵母の自己消化液による生育促進効果は、この実験においても認められ、諸味熟成における主醸酵酵母の重要性は、従来伝えられていたような単なる糖分分解とアルコール生成などの生産性ととどまらず、その自己消化によって細胞内容物を供給し、後熟酵母の生育を著しく促進する点にあることを示唆する興味ある結果となった。

第3節 *Torulopsis etchellsii* の分別計数

前節において、*T. etchellsii*が栄養的に好適な条件下であっても、37°C以上では生育できないことが明らかとなったので、この温度で充分生育できる*T. versatilis*と分別計数することが可能かどうかを検討した

実験方法

a) 供試菌株

前節I.において使用した *T. versatilis* (1C2) および *T. etchellsii* (1C3₂) 各1株を用いた。

b) 試験方法

麴エキスを培地とした振盪培養を行なって得た純粋培養菌体を用い、本章第1節におけると用様にN-培地による平板培養を行ない、これを27°Cおよび37°Cに同時に培養して、両温度培養におけるコロニー数の差をもって *T. etchellsii* の菌数とした。

結果および考察

T. versatilis と *T. etchellsii* をそれぞれ単独に、または混合して試験した結果を表17に示した。表には、各菌または菌群について、各培養温度ごとに計測したコロニー数を示してある。これによると、*T. versatilis* はいずれの温度においてもよく生育しているが、*T. etchellsii* は37°Cでは全く生育せず、両者を混合した場合にも温度によってよく分別計数されることが確かめられた。

したがって、本章第1節における分別計数法にさらにN-培地培養の平板を、27°Cと37°Cとに培養する方法を加えることによって、*T. etchellsii* の消長をも見極めることができると考えられる。

表17 生育温度差による *T. versatilis* および *T. etchellsii* の分別計数

菌種 (細胞数)	N-培地により計測した菌数 (コロニー数)	
	27°C 培養	37°C 培養
<i>T. versatilis</i> (350)	326	315
<i>T. etchellsii</i> (200)	143	0
両者混合	228	143
内訳 <i>T. versatilis</i>	154	148
<i>T. etchellsii</i>	78	0

N-培地組成:

KNO₃ 0.08%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7aq. 0.05%
NaCl 10%, グルコース 2%, 寒天 2%

第4節 要約

1. 醤油諸味中の主要酵母が耐塩性であること、主醸酵に関与する *Saccharomyces* 属酵母群がフラクトース同化性で硝酸カリ非同化性であること、後熟に関与すると思われる *Torulopsis* 属酵母群がフラクトース非同化性で硝酸カリ同化性であること、を利用した選択培地(表12)により、*S. rouxii*, *S. cerevisiae* の一群 (*Sac-*

charomyces 属酵母群) と、*T. versatilis*, *T. etchellsii* の一群 (*Torulopsis* 属酵母群) とを分別計数できることが分り、実際の諸味についてもこの両酵母群を分別計数してその消長を検討できることが確かめられた。

2. 熟成に関与し、風味向上に役立つと思われる *T. etchellsii* の生育を促進するため、温度および栄養条件について検討した結果、1) この酵母の生育には食塩の存在が必要であること、2) 32°C以下の比較的低い培養温度が必要であること、3) ビオチンなど5種類の栄養源に幾らかの促進効果が見られること、4) 特に酵母エキス、麴エキス、麴エキスとペプトン、および主醸酵酵母 *S. cerevisiae*, *S. rouxii* の自己消化液の添加は著しい促進効果をもつことが分った。したがって、諸味中での *T. etchellsii* の増殖を最も効果的に促進するには、主醸酵酵母群の十分な繁殖が必要であり、温度管理が重要な意義をもつものと考えられた。

3. 好塩性の *Torulopsis* 属酵母群の選択用N-培地で生育できる *T. versatilis*, *T. etchellsii* のうち、前者は37°Cによく生育するが、後者は、栄養的に好条件の場合でも37°C以上では生育できないことが分った。この特性を利用して、N-培地を用いた稀釈平板培養を27°Cおよび37°Cで行なうことにより、その菌数の差から *T. etchellsii* を分別計数できることが確かめられた。

第6章 純粋培養酵母の添加による醸造試験

第2章までに、醤油諸味から分離した酵母のうち、*S. cerevisiae* および *S. rouxii* を含む耐塩性の *Saccharomyces* 属酵母群が主醸酵を行ない、*T. versatilis*, *T. etchellsii* など好塩性の *Torulopsis* 属酵母群が後熟に関係するもので、特に後者は、香気付与などの点で品質に大きな影響を与えることを推測した。さらに前章までに、この両群は生理的諸性質の差を利用した選択培地によってほぼ分別計数できることが分った。

本章においては、これらの知見を実際に適用して、諸味の品質向上をはかるための小規模な醸造試験を企図し、上記主要酵母の純粋培養添加諸味について *Saccharomyces* 属、*Torulopsis* 属両酵母群の動態と品質に対する影響を見、品質向上のための方策を検討した。

第1節 主要酵母添加の影響

醤油諸味中の主要酵母 *S. cerevisiae*, *S. rouxii*, *T. versatilis*, および *T. etchellsii* を添加して醸造試験を行ない、*Saccharomyces* 属、*Torulopsis* 属両酵母群の消長と、品質に対する影響を検討した。

醸造試験に際し、最も留意しなければならないのは、小規模の試験でしばしば陥り易い環境因子、例えば温度など、の著しい不均衡や変動を出来るだけ避けることで、この実験では、ポリエチレン袋詰めとした諸味を、仕込1日後の60石タンク（コンクリート製、約11 kℓ）中に沈めて培養する方法をとった。

実験方法

a) 供試菌株

前章において使用したと同様の *S. cerevisiae* (16C4), *S. rouxii* (1C3₁), *T. versatilis* (1C2), および *T. etchellsii* (1C3₂) の4株を用いた。

b) 添加用酵母の培養と調製

酵母は15%の食塩を加えた PGagar の前培養から500 ml 容振盪フラスコ中の、10%の食塩を含む麹エキス (11°Blg.) 50 ml に接種し、30°C で5日間振盪培養後、適当本数のフラスコの菌体を遠沈し、滅菌生理食塩水で洗滌した後、泥状のまま添加用とした。

c) 諸味仕込と酵母添加

仕込諸味は、脱脂大豆：小麦：麴が5：4：1の重量比のもので、これを2枚重ねにしたポリエチレン袋（幅60 cm、長さ65 cm、厚さ0.3 mm）に食塩水とともに入れ、諸味10 kg 当り酵母10 g（湿重量）を添加した後、紐で袋の口を軽く閉じ、醗酵槽中に沈めて培養した。培養中、諸味は適時拌攪した。

純粋培養酵母の添加は、表18に示すように行ない、4菌株をそれぞれ単独に仕込時および1カ月後に添加したもの、4菌株を混合添加したもの、および対照として酵母無添加のもの、の10試験区とした。

d) 試料採取

試料採取は、仕込直後、1カ月後、および3カ月後の3回行ない、酵母を添加した後充分混和して採取した。

e) 温度、水分、pHの測定

諸味各試料について、温度、水分（Kettの赤外線含水率計による）およびpH（日立、Horiba D-5型による）を測定した。

f) 菌数測定

菌数測定は前章第1節の方法により、稀釈平板培養を行なって分別計数し、*Saccharomyces* 属、*Torulopsis* 属両酵母群の消長を見た。

g) 品質評価

3カ月後の諸味について醸造工場の専門家3名、応用菌学教室員3名による官能検査を行ない、香気を中心とした評価を総合して品質を判定した。

結果および考察

諸味の温度、水分およびpHの変化と菌数変化は表19に示した通りである。また、3カ月後の香気等の品質評価も表に加えた。

仕込直後から1カ月後、および3カ月後に至り、品温は15°C、20~24°C、32°Cに上昇し、水分は63から66.5%に増加した。pHは仕込後5.4から3カ月後、4.4程度まで低下した。

酵母菌数は、S-培地による耐塩性酵母菌数(S)、F-培地による *Saccharomyces* 属酵母菌数(F)、およびN-培地による *Torulopsis* 属酵母菌数(N)、それぞれについて、各試料ごとに諸味1g当りの価を10²のorderで表わし、平行試験結果の平均で示してある。品質は+で表示し、+の数の多い程優れたものとした。

これによって菌数変化を見ると、概して、仕込直後から1カ月経過諸味まではほとんど変わらず、比較的高温となった3カ月目に至り著しい増殖を示した。すなわち、耐塩性酵母菌数は、仕込直後、1gあたりはほぼ10²程度で、最初の1カ月間では *Saccharomyces* 属酵母群が若干増加し、*Torulopsis* 属酵母群がわずかに減少する傾向が見られる程度で、全体として大きな変化はない。これは、恐らく仕込当初の品温が15°Cとかなり低く、その後徐々に上昇したとはいえ、1カ月後でもなお20~24°Cであったため、増殖が円滑に進まなかったことによると思われる。3カ月後の諸味中の菌数は、いずれも1g当り10⁴~10⁵のorderとなり、仕込時の100~1000倍の増加を示し、温度上昇とともに酵母の増殖が盛んになったことを示している。

主醗酵は、佐合氏⁷⁹⁾も指摘したように、2カ月前後で終了すると思われ、諸味の性格も3カ月後すでにかなり

表18 仕込諸味への純粋培養酵母添加処理(1)

試験区	処 理
0	酵母無添加(対照区)
1	仕込時 <i>S. cerevisiae</i> 添加
2	仕込時 <i>S. rouxii</i> 添加
3	仕込時 <i>T. versatilis</i> 添加
4	仕込時 <i>T. etchellsii</i> 添加
5	仕込時4種混合添加
6	仕込1カ月後 <i>S. cerevisiae</i> 添加
7	仕込1カ月後 <i>S. rouxii</i> 添加
8	仕込1カ月後 <i>T. versatilis</i> 添加
9	仕込1カ月後 <i>T. etchellsii</i> 添加
10	仕込1カ月後4種混合添加

添加量はいずれも諸味湿重10 kg 当り酵母湿重約10 g

表19 純粋培養酵母添加仕込諸味の醗酵経過と酵母数変化

経過時間 (月)	0			I			III			官能検査 による 香 気
温 度 (°C)	15			20~24			32			
水 分 (%)	63			62			66.5			
pH	5.2~5.4			5.2			4.4~4.6			
試験区 0	2.4	0.9	1.1	4.9	0.5	1.3	400	160	240	+
1	2.4	0.4	1.5	4.6	0.4	1.4	1050	480	610	+
2	2.5	0.5	1.4	3.2	0.3	1.3	1100	500	680	+
3	7.5	4.2	2.6	7.2	2.5	3.4	4300	2780	1720	+
4	7.0	3.7	2.4	7.4	3.2	2.8	2000	1040	780	+
5	4.0	1.3	2.2	10.9	3.5	6.3	4500	1500	3500	+
6	3.2	1.2	1.9	8.3	0.9	6.4	1080	552	528	+
7	4.0	1.2	2.2	18.4	0.6	15.5	1100	530	620	+
8	5.7	3.4	1.5	24.0	1.5	19.0	2670	2030	540	+
9	3.7	2.0	1.4	9.3	1.4	7.8	3500	1840	1650	+
10	5.6	2.5	2.1	5.8	2.4	3.2	5850	4400	1380	+
	S	N	F	S	N	F	S	N	F	

1. 選択培地 (S, N, および F) 上のコロニー数から算出した諸味湿重 1g 当りの酵母数×10²

2. 卍: 香気著しく優れたもの 卍: 香気良好のもの 卍: 香気特にならないもの

十: 香気余りよくないもの

明瞭となった。

酵母無添加区 (0 試験区) の諸味はいわば平均的な品質で、これを標準にとり 卍 で表わせば、*S. cerevisiae* (試験区 1 および 6)、*S. rouxii* (試験区 2 および 7) それぞれを単独に添加した諸味では、いわゆる“田舎づくり”とか“醤油臭さ”とかいわれる諸味臭があつて、標準に近いが、またはそれ以下という評価で、必ずしもよい諸味とは言えなかった。これらはいずれも *Saccharomyces* 属酵母群がよく増殖して *Torulopsis* 属酵母群より菌数の多いのが特徴である。これに反して、*T. versatilis* (試験区 3 および 8) と *T. etchellsii* (試験区 4 および 9) とをそれぞれ単独に添加した諸味では、*Torulopsis* 属酵母群の増殖が顕著で、いずれも香気あるよい品質となった。特に *T. etchellsii* を添加した試料 (試験区 4 および 9) では、芳香が著しく、この添加により香味ともに優れた品質となることが分つた。*T. versatilis* を仕込 1 カ月後に添加した諸味 (試験区 8) は、*Torulopsis* 属酵母の増殖があつたにかかわらず、評価はよくなかつた。これは“産膜臭”が影響したもので、異常醗酵によるものと見られる。4 種の酵母を混合添加した場合の影響は、顕著には認められなかつた。

これらのことから、*Torulopsis* 属酵母の添加が特に香気付与、品質向上の鍵になると思われ、このためには、

この種酵母の純粋培養添加は効果的であり、中でも *T. etchellsii* の添加は著しい効果をもつものと考えられた。

添加時期については、仕込時から 1 カ月間がかなりの低温であつたために、添加時期による目立った差がないようで、この点については *Saccharomyces* 属酵母群の生育とも関連してさらに検討が必要と思われる。

第2節 *Torulopsis etchellsii* の添加効果

前節において、諸味品質の向上に、*T. versatilis* および *T. etchellsii* の添加効果が優れ、特に後者の添加が著しい効果を示すことが分つたが、この点をさらに確めるため、*T. etchellsii* を中心とした純粋培養酵母の添加効果をしらべ、品質向上のための方策を検討した。

実験方法

使用菌株、培養法、試験法などは前節と同じであるが、純粋培養酵母の添加は表 20 に示すように行なつた。すなわち、*S. cerevisiae*、*S. rouxii*、*T. versatilis* および *T. etchellsii* 4 菌株をそれぞれ仕込時および 1 カ月後に添加したものと、*S. cerevisiae* または *S. rouxii* 添加 1 カ月後の諸味それぞれに、さらに *T. etchellsii* を添加したものと、との 1~10、合計 10 の試験区と、酵母無添加の対照区 11 とを用意した。また、試料採取は仕込直後と、その後 1 カ月毎に 5 回、の 6 回行ない、酵母菌数測

表 20 仕込諸味への純粋培養酵母添加処理 (2)

試験区	処 理
1	仕込時 <i>S. cerevisiae</i> 添加
2	仕込 1 ヶ月後 <i>S. cerevisiae</i> 添加
3	仕込時 <i>S. cerevisiae</i> 添加, 1 ヶ月後 <i>T. etchellsii</i> 添加
4	仕込時 <i>S. rouxii</i> 添加
5	仕込 1 ヶ月後 <i>S. rouxii</i> 添加
6	仕込時 <i>S. rouxii</i> 添加, 1 ヶ月後 <i>T. etchellsii</i> 添加
7	仕込時 <i>T. versatilis</i> 添加
8	仕込 1 ヶ月後 <i>T. versatilis</i> 添加
9	仕込時 <i>T. etchellsii</i> 添加
10	仕込 1 ヶ月後 <i>T. etchellsii</i> 添加
11	酵母無添加 (対照区)

定に当たっては、前章第 3 節の方法により、*T. etchellsii* の菌数変化も測定した。*Torulopsis* 属酵母菌数中、N-培地、37°C 生育の酵母は *T. versatilis* として扱った。

結果および考察

1. 温度, pH, および水分変化

醱酵期間中の温度, pH, および水分変化を図 19 に示した。

温度は、仕込時 22°C から 1, 2 ヶ月後 32°C に上り、3 ヶ月以降、25°C 前後となり、5 ヶ月後、22°C に低下し

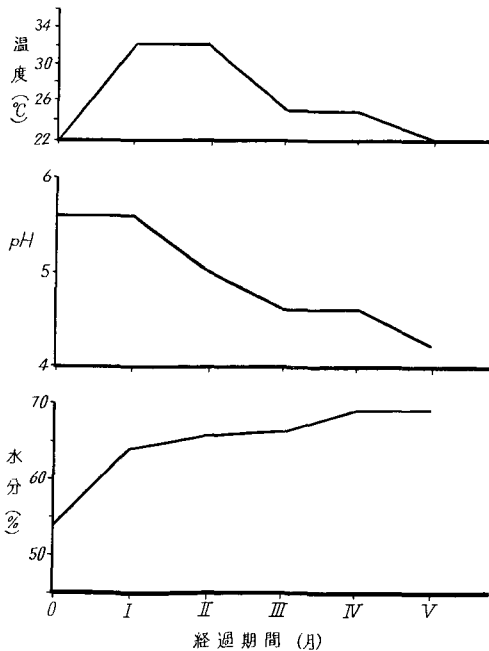


図 19 純粋培養酵母添加仕込諸味の醱酵経過 (温度, pH, および水分変化)

た。pH は、仕込直後の 5.6 から次第に下がり、5 ヶ月後 4.2 前後となった。水分は 55% 程度から増加を続け、終了時には 67~68% に達した。

2. 酵母群の消長と諸味品質

醱酵期間中の各酵母群の消長と品質に関する官能検査結果を図 20 (a~e) に示した。図は、主醱酵を行なう *Saccharomyces* 属酵母群 (点線) と、後熟に関与する *T. versatilis* (実線) および *T. etchellsii* (太線)、それぞれ

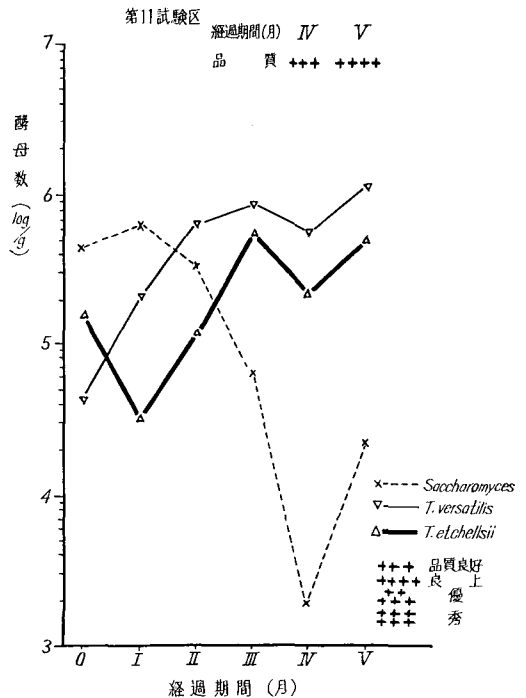


図 20-a 純粋培養酵母添加仕込諸味中の酵母数変化と諸味品質 (第 11 試験区: 対照区)

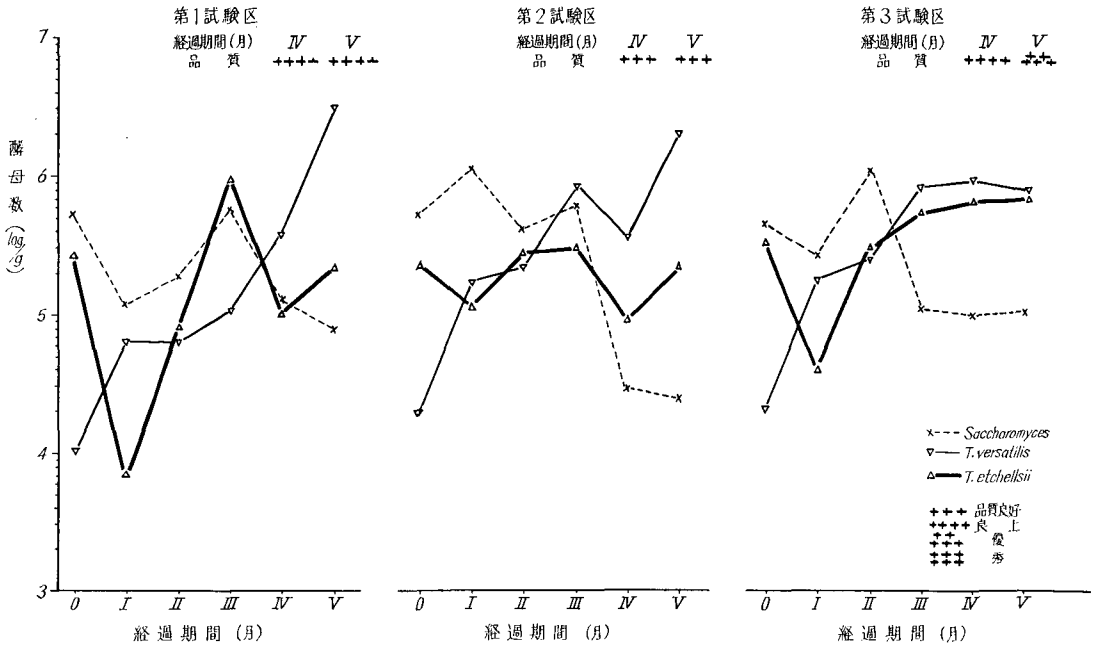


図 20-b 純粹培養酵母添加仕込諸味中の酵母数変化と諸味品質 (第1, 2, および3試験区)

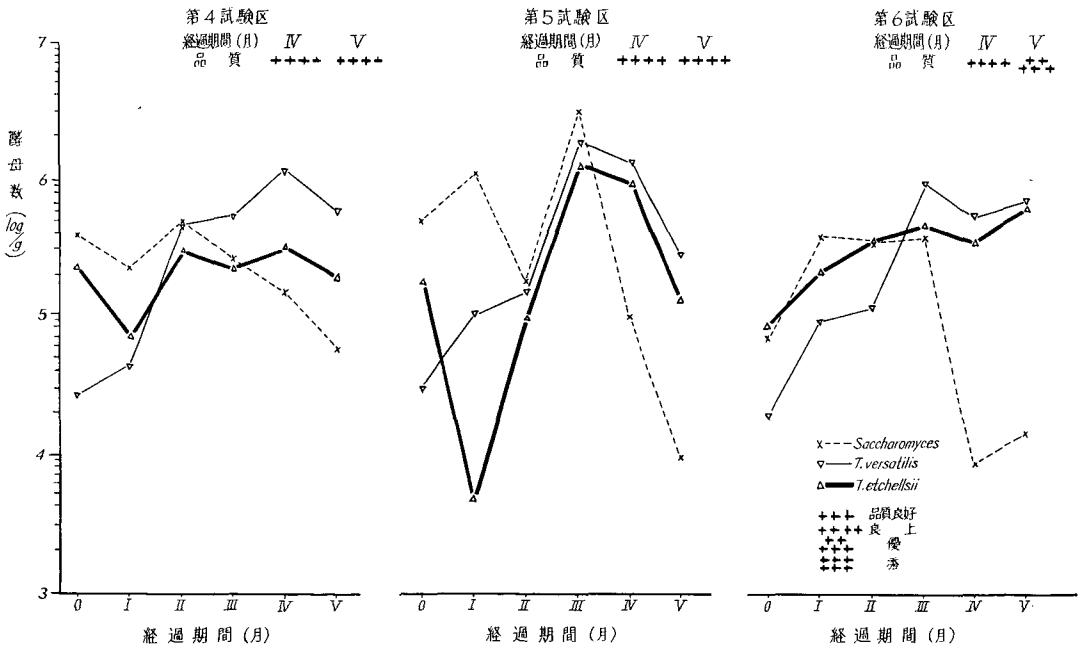


図 20-c 純粹培養酵母添加仕込諸味中の酵母数変化と諸味品質 (第4, 5, および6試験区)

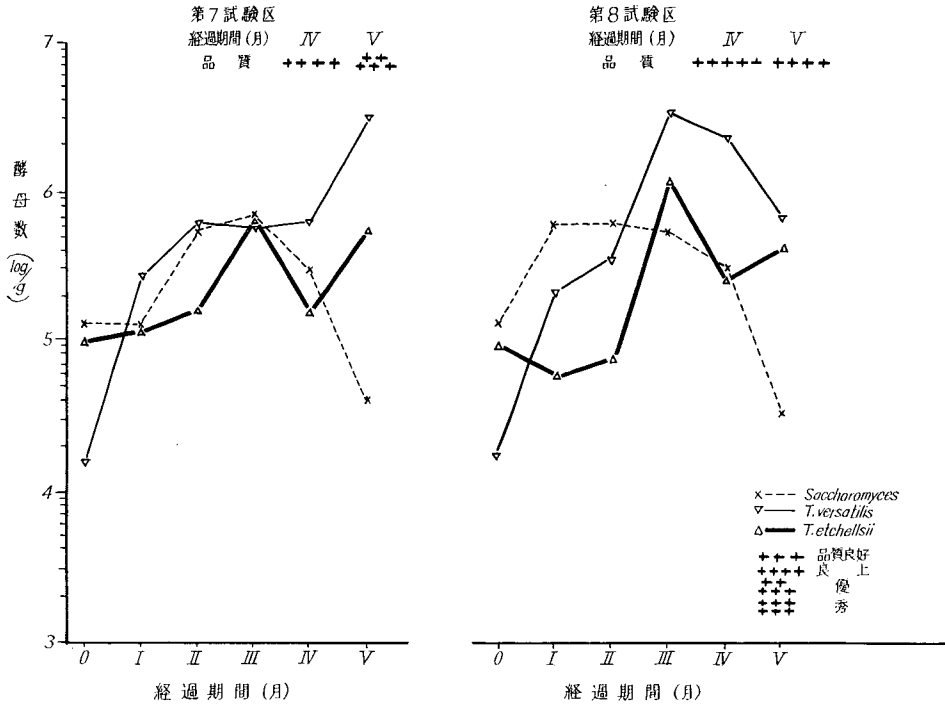


図 20-d 純粋培養酵母添加仕込諸味中の酵母数変化と諸味品質 (第7および8試験区)

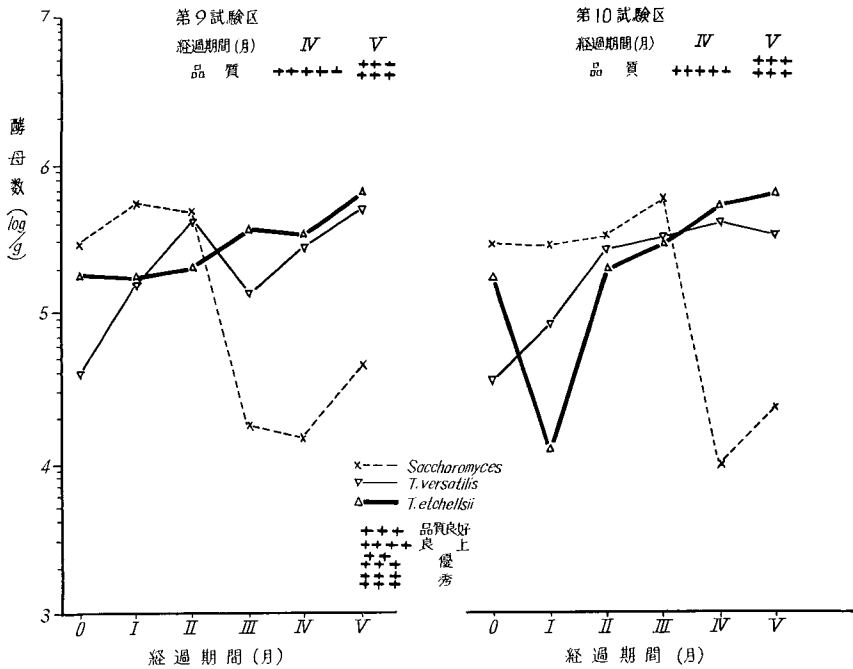


図 20-e 純粋培養酵母添加仕込諸味中の酵母数変化と諸味品質 (第9および10試験区)

の菌数を対数でとり、培養月毎の値を結んでグラフとしたものである。また、各諸味について4カ月目および5カ月目の香気を主とした品質評価を+の数で表わして併記し、+の数の多い程優れたものとした。

まず、培養酵母無添加の対照区、第11試験区における菌数変化を見ると(図20-a)、*Saccharomyces* 属酵母群は1カ月後に一度増殖するが、その後は著しく減少した。この消長は、温度変化の影響を強く受けたものと見られるが、3カ月以降ではかなりの細胞崩壊が起きているものと考えられる。*T. versatilis* は最初の3カ月間に著しく増加し、3~4カ月後に一時減少するが再び徐々に増加する傾向を示した。*T. etchellsii* は、1カ月後に減少した後増加するが *T. versatilis* にくらべて菌数は少ない。全体としては *Saccharomyces* 属酵母群が増加し、減少するのと入れ違いに *Torulopsis* 両種酵母が相伴って増加する形となるもので、従来、この種の研究で、一般に認められている、醸造過程における微生物相の変遷の型、例えば、天然諸味醸造などで酵母が夏期に増殖した後、長期間に亘りほぼ定常的菌数を示す¹¹⁹⁾ といった型は、内容的には主醸酵酵母と後熟酵母の交代が行なわれているものであることが、ここで明らかとなったわけで、熟成期間中も数的には変動のないままに見過されていた酵母の意義が、これによって明確にされたといえる。

香気を主とした官能検査の結果は良好で、ほぼ標準的な品質と評価された。

図20-bは、*S. cerevisiae* を仕込時(第1試験区)、1カ月後(第2試験区)にそれぞれ添加した結果と、仕込時に *S. cerevisiae* を、1カ月後にさらに *T. etchellsii* を添加した諸味(第3試験区)での酵母の動態を示したものである。

仕込時に添加した第1試験区において *Saccharomyces* 属酵母群は、1カ月以降3カ月後までに増加してかなり高いレベルとなった後減少し、*T. versatilis* は対照区と同様よく増殖し、特に3カ月以降急激な増加を示した。また、*T. etchellsii* は1カ月後から3カ月後にかけて著しく増加した。したがって、この諸味は、対照区にくらべると、3カ月後における *Saccharomyces* 属酵母群と *T. etchellsii* の、また、4カ月以降における *T. versatilis* の増加が特徴的である。官能検査の結果は最終的にはほぼ標準的な品質とされたが、3カ月後の諸味が香気優れた品質と評価されており、*T. etchellsii* の著しい増殖が好影響を与えたものと考えられる。

仕込1カ月後に添加した第2試験区は、*T. versatilis* が対照区とほぼ同程度の増殖を示しただけで、他の酵母

の生育は悪く、特に *T. etchellsii* はほとんど増殖していない。品質も全試料中最も劣ったものとなった。

仕込時に *S. cerevisiae* を、1カ月後に *T. etchellsii* を添加した諸味(第3試験区)では、2カ月後の *Saccharomyces* 属酵母群の増加が顕著であり、*T. versatilis* は対照区とほとんど同じ傾向を示したが、*T. etchellsii* は1カ月後から急激に増加し、その後も徐々に上昇を続けて高いレベルに達する特徴を示した。官能検査結果も香気よく、品質の基だ優れた諸味となり、*Saccharomyces* 属酵母群の増殖に続いて *T. etchellsii* の順調な増加が好影響を示したと見てよい。

S. rouxii 添加の諸味(第4,5および6試験区、図20-c)のうち、仕込時添加の第4試験区において、*Saccharomyces* 属酵母群は一時的な減少、2カ月後における増加とその後の低温期における減少など、*S. cerevisiae* 添加の諸味第1および3試験区における同群の動向とほぼ同じ経過をとったが、増殖程度は低く、対照区よりは幾分よいという状態に過ぎなかった。*T. versatilis* は対照区とほぼ同様の消長を示したが、*T. etchellsii* の生育は悪く、2カ月以後、ほとんど頭打ちの形となった。品質も対照区にくらべて幾分良好といえる程度であった。

これに反して、仕込1カ月後に *S. rouxii* を添加した諸味(第5試験区)では、*Saccharomyces* 属酵母群の増加が著しく、*Torulopsis* 属酵母群もこれを追う形で急速に増加するが、温度が低下して、*Saccharomyces* 属酵母群が減少した後、*Torulopsis* 属酵母群もこれにつれて著しく減少するという激しい動きを示した。この諸味の香気、品質は、かなり優れたものと評価され、*Saccharomyces*、*Torulopsis* 両属酵母群の良好な生育が影響したのと考えられる。

S. rouxii を仕込時に添加し、1カ月後に *T. etchellsii* を添加した諸味(第6試験区)では、*T. versatilis* が対照区と同様の増加傾向を示したほかは、*Saccharomyces* 属酵母群が最初の1カ月間にかなりの増殖を示したことで、*T. etchellsii* が醸酵初期から中期、後期へと徐々に菌数を増加したことが特徴的で、風味、品質の良好な諸味となった。

試験区7および8(図20-d)は、*T. versatilis* を仕込時および1カ月後にそれぞれ添加したもので、*Saccharomyces* 属酵母群および *T. etchellsii* の消長は対照区とほとんど同じであるが、*T. versatilis* は初期に急激に増加したほか、後期にさらに著しく増加しており、添加した *T. versatilis* が充分生育していることが認められる。また、この諸味は、いずれもかなり優れた風味とされ、

T. versatilis の添加も効果的であることが確かめられた。

T. etchellsii を仕込時および1カ月後に添加した第9および10試験区(図20-e)では、*Saccharomyces* 属酵母群と *T. versatilis* はともに対照区におけるとはほぼ同様の傾向を示したが、*T. etchellsii* の生育がよく、順調に生育し続けている点で特徴的である。また、この諸味はともに芳香を有して格別に優れたものと判定された。

これらのことから、添加した酵母は大体において諸味中でよく発育し、*T. versatilis* および *T. etchellsii* はその添加によって、諸味の香気を増し、品質を良くする特性のあることが確かめられた。ことに *T. etchellsii* は、単独添加の場合でも、*S. cerevisiae* あるいは *S. rouxii* 添加後に加えた場合でも、順調な生育を示すと同時に、いずれも優れた風味の諸味とした。

また、*Torulopsis* 属酵母群の増殖は、*Saccharomyces* 属酵母群が増殖した後を追う形で認められる場合が多く、特に *T. etchellsii* が十分に増殖するには *Saccharomyces* 属酵母の十分な増殖が必要な前提といえる。このことは、前章第2節の実験結果に示された *Saccharomyces* 属酵母の自己消化液による生育促進作用と解釈してよいであろう。

酵母の生育が、その環境温度によって影響されることは当然であるが、ことに食塩濃度の高い条件下ではその影響が強まることは考えられ、*Saccharomyces* 属酵母は、30°C前後でよく増殖するが温度の低下によって著しく減少することが分り、細胞の崩壊も考えられるほどであった。しかし、このような条件でも *Torulopsis* 属酵母は増殖できるのであり、特に *T. etchellsii* は漸次増加の一途をたどり、*Saccharomyces* 属酵母群増殖後の多数の細胞の崩壊と低温とがむしろ *T. etchellsii* などに好適な条件を与えたと見るべきである。したがって、醸酵の初期には比較的高温として *Saccharomyces* 属酵母群の増殖を促し、その後、すみやかに低温として、この細胞の崩壊と *T. etchellsii* の増殖をはかる、など、諸味の温度管理に留意することが必要と思われる。

第3節 要 約

1. ポリエチレン袋に仕込んだ諸味を醸酵槽諸味中に沈める方法で、*S. cerevisiae*、*S. rouxii*、*T. versatilis* および *T. etchellsii* (いずれも北海道産醤油諸味中より分離したもの) の4種の純粋培養を諸味に添加して醸造し、3カ月にわたり耐塩性酵母群、*Saccharomyces* 属酵母群、および *Torulopsis* 属酵母群の消長と諸味品質に対する影響を検討した。その結果、*Saccharomyces* 属

酵母群にくらべて、*Torulopsis* 属酵母群がよく増殖した諸味は品質がよく、*Torulopsis* 属酵母の添加が品質向上に効果的なことが認められた。特に、*T. etchellsii* の添加効果は著しく、香気のよい優れた品質の諸味となることが分った。

2. 同様の方法により、4種の純粋培養を、*T. etchellsii* を主体とし、この酵母を *Saccharomyces* 属酵母添加1カ月後にも加える形も含め、添加、試験した結果、*T. versatilis* および *T. etchellsii* の添加が優れた品質の諸味を得るために効果的であり、特に、*T. etchellsii* の添加は、香気、風味の格段と優れた諸味とすることが確かめられた。

3. *Saccharomyces* 属酵母群が充分生育した後、減少すると入れ違いに *Torulopsis* 属酵母群がよく増殖するといった形をとった諸味では、*Torulopsis* 属酵母の添加効果が十分に認められ、醸造に際しては、初期に高温として *Saccharomyces* 属酵母群を短期間に十分に増殖させた後、低温としてこの細胞崩壊を促し、同時に *Torulopsis* 属酵母、特に、*T. etchellsii* の増殖をはかるなど、酵母の添加とともに温度管理に対する留意の必要を認めた。

考 察

1. 北海道産醤油諸味酵母の種類と分布について

わが国古来の醤油酵母、*Saccharomyces soja*、*Zygosaccharomyces soja*、*Z. japonicus*、*Z. major* などを含む *Saccharomyces rouxii* は、北海道産醤油諸味中にも広く、かつ多量に存在し、分離した742株中、309株を占めていて、醤油諸味醸酵の主役をなしていることがうかがえる。この酵母は、食塩濃度の高い培地で培養すると、液体、固体のいずれにも厚い皺のある皮膜をつくるが、このことは、高橋、湯川両氏^{18,19)}、大西氏^{83,117)} によってすでに認められ、大西氏はこれを特性として扱い、変種を設けているほどである。接合により、1~4個の子嚢胞子を形成するが、この胞子形成は、分離と保存に際して食塩含有培地を用いた培養で甚だ多く認められ、食塩濃度が高い程、胞子形成が著しいという傾向が認められた。また、胞子を形成した培養表面が次第に皺状になり、この皺状が *Coadida* や *Trichosporon* などに見られる疑菌糸の形成によるものでないことも観察した。したがって、このような皮膜形成と胞子形成、食塩濃度との間にはかなり密接な関係があるように思われ、ここでは特に変種として扱わなかった。

糖類醸酵性に関して、*S. rouxii* はグルコースとマル

トースを醗酵し、グルコース、ガラクトースおよびマルトースを同化するのをたてまえとするが、その他の形態学的、生理学的諸性質が全く同じで、明瞭なサッカロース醗酵性を示したものがかなりあり、これらを *S. cerevisiae* として、また、これから孢子形成能を失なつたと見られる一群を *Torulopsis sake* として、それぞれ扱った。しかし、*S. cerevisiae* としたものも LODDER 女史⁸¹⁾ の記載では稀であるとされている同体接合による子嚢形成と、4個の孢子形成が非常にしばしば見られる点、液体培地上に厚くクリーム色の輪状に発育する点、固体培地上の培養が白堊光沢、皺を有する点、などの特異な性格があり、これらはむしろ *S. rouxii* に酷似するものである。さらにまた、*S. rouxii*, *S. cerevisiae* としたものの中には、長期間の保存培養によってサッカロースの醗酵性、同化性を示すようになるもの、失なつたと考えざるを得ないもの、などが認められたことから、これら *S. rouxii*, *S. cerevisiae*, *T. sake* の3者は、培養上の皺の形成、孢子の形成、およびサッカロースの醗酵性と同化性に関して連続的なもので、むしろ *Saccharomyces* 属酵母群として一括できると考える。

S. rouxii のサッカロース醗酵性については、STELLING-DEKKER 女史¹⁹⁹⁾ と LODDER 女史⁸¹⁾ が酵母分類に際して詳細な検討を行なっているが、この性格は極く弱いか、またはかなり不安定なものであることを示唆している。このことはまた、最近に至って SCARR 氏²²⁵⁾ が、サッカロース醗酵性が条件によって変わり得ることを指摘したこと、SCHEDA, YARROW 両氏²³⁸⁾ が酵母によるガラクトース、サッカロース、マルトース、ラフィノースの醗酵性、同化性は不安定で、連続的に相互に変わり得る一群の酵母のあることを実証したこと、によつても支持される。この性格については食塩濃度の高い特殊な環境が影響していることも考えられるが、いずれにしてもサッカロースを分類上の標識とすることは不安であり、今後の検討を要する。

この点は、好塩性で芳香を生ずる *T. versatilis* や *T. etchellsii* についても認められ、前者においてはサッカロース醗酵性、同化性が陽性のものから極く弱いもの、したがってラフィノースの醗酵性が 3/3, 2/3, 1/3 の陽性のものや陰性のものが得られており、後者においては、サッカロース、マルトースの同化性が陽性のもの、および陰性のものを含み、他の性質が全く同じであり、また他の種に一致するものもなく、SCHEDA 氏ら²³⁸⁾ が述べているように分離源が同一であることから、同じ origin から系統を引いて来たものと解釈するのが妥当と考え、

これらをそれぞれ一括して *T. versatilis* あるいは *T. etchellsii* として扱った。

T. versatilis, *T. etchellsii* に性格類似の酵母として、*T. magnoliae*, *T. nodaensis* の硝酸カリ同化性群と、*T. gropengiesseri*, *T. bacillaris*, *T. famata* の硝酸カリ非同化性群が得られている。これらはいずれも細胞の形態、大きさ、培養諸性質が近似していて糖類醗酵性と同化性によつておのおの区分される。*T. magnoliae* は *T. etchellsii* に非常に近い性格を有し、マルトースの醗酵性、同化性をなくした形と考えられる耐塩型の酵母である。*T. gropengiesseri* は *T. magnoliae* の硝酸カリ同化性の陰性となった形と考えてよく、その他の諸性質は相互によく一致している。同じ関係は *T. etchellsii* と *T. famata* についても見られ、後者は、硝酸カリ同化能をもたない以外は諸性質極めてよく *T. etchellsii* に近似している。これら酵母が、地域と余り関係なく、ほぼ良質の諸味に同時に存在する傾向のあることは、上記 SCHEDA 氏らの記述をまつまでもなく、品質との関連とともに酵母相互に密接な関係をもつものとして興味深い。

醤油諸味には「白かび菌」と一般に呼ばれている産膜性酵母があり、古くは、*Saccharomyces farinosus*⁸⁾, *Zygosaccharomyces japonicus*⁹⁾, *Pichia moniliformis*¹²⁾, *Z. salsus*¹⁷⁾ などがこれに該当する。このうち、*Z. japonicus*, *Z. salsus* はともに *S. rouxii* に含まれているが、北海道の試料中、白色で皺のある顕著な皮膜を形成する酵母としては、*S. rouxii* とその類縁の一群のほか、*Hansenula anomala*, *H. subpelliculosa*, *Debaryomyces halotolerans* がある。これら産膜性の *Hansenula*, *Debaryomyces* は耐塩性もあり、醤油諸味上に容易に生育し得ることは考えられるが、実際には極めて限られた一部の諸味にわずかに存在していたに過ぎない。

諸味から得られた *Candida* 属酵母や *sporobolomyces*, *Rhodotorula* 両属の赤色酵母は、自然界に広く分布する種類である。これらは試料中での出現頻度も小さく、分布も限られた一部でもあり、食塩耐性も余りないことから、醤油諸味にとっては混入雑菌と見た方が妥当であろう。

したがって、北海道産醤油諸味中の酵母は、*S. rouxii* と *S. cerevisiae*, その不完全型の *T. sake* を含む *Saccharomyces* 属酵母群と、*T. versatilis* と *T. etchellsii* を主とし、これらと類縁の酵母を含む好塩性ないし耐塩性の *Torulopsis* 属酵母群とが大部分を占め、*Saccharomyces* 属酵母群はその強い醗酵性によって主醗酵を行な

うもの、*Torulopsis* 属酵母群はその芳香性と好塩性とから熟成に関与するものと見てよい。

因みに、大西氏^{83,84,117,218}が主として野田地方産の醤油諸味などから分離した150株の酵母について研究した結果を見ると、仕込初期の諸味から得た酵母は、*Pichia farinosa*, *Torulopsis famata*, *Candida polymorpha*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. rugosa*, *Trichosporon behrendii*, *Tr. cutaneum* の4属8種に、醗酵期の諸味から得た酵母は、*S. rouxii*, *S. rouxii* var. *halomembranis*, *S. acidifaciens*, *S. acidifaciens* var. *halomembranis* の1属2種、2変種に、また、醗酵後期の古い諸味から得た酵母は、*Torulopsis halonitratophila*, *T. halophilus*, *T. nodaensis*, *T. versatilis*, *T. etchellsii*, *T. sphaerica*, *T. sake* の1属7種に、それぞれ分類されており、供試菌150株の大部分は *S. rouxii* であったと報じている。このうち *S. acidifaciens* としたものは、細胞形が短く、LODDER 女史⁸¹の記載が長卵形なものとはかなり異なり、その他の諸性質から見て、むしろ *S. mellis* とすべきものと思われる。

S. rouxii var. *halomembranis*, *S. acidifaciens* var. *halomembranis* は、それぞれの種から含塩培地で黽のある被膜をつくる点だけが異なる変異株である。

醗酵後期の *Torulopsis* 属酵母のうち *T. halonitratophila*, *T. halophilus*, *T. nodaensis* はいずれもガラクトース、サッカロース、マルトースの醗酵性、同化性を異にする点で分けられているが、*T. etchellsii* とは諸性質が極めてよく似た近縁種である。

これらのことから、北海道産醤油諸味中の酵母は、内容的には野田産の諸味におけるとはほとんど差はないと考えられる。

2. 食塩濃度と酵母の生育および醗酵との関係

微生物の耐塩性が問題とされる場合、多くは「生育の限界」によって表現されるが、生育の度合、活性など、限界濃度以内における状態も菌の性格をよく反映するものである。生態学的にはむしろ食塩の種々の濃度における菌の対応が重要である。

FLANNERY 氏²³⁹は好塩細菌の概念を規定する意味で、食塩に対する態度によって細菌を次のように分けている。

I. Nonhalophiles.

- A. Salt-sensitive ……食塩2%以下でのみ生育
- B. Salt-tolerant ……2%以下でよく生育するが、2%以上でも生育

II. Halophiles.

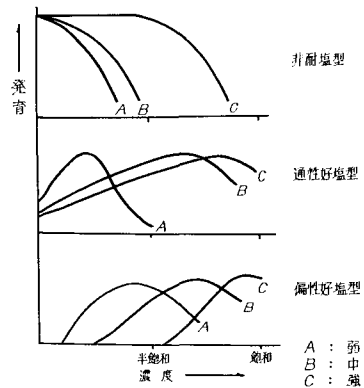


図21 微生物の発育と塩濃度との関係

INGRAM. M.: *Microbial Ecology*, p. 90 (1957), Cambridge Univ. Press. London and New York.

A. Facultative ……2%以下でも生育するが、2%以上でよく生育。

B. Obligate ……2%以上でのみ生育。

また、INGRAM 氏²⁴⁰はその内容をも考慮に入れて、図21に示すように耐性を Intolerant (非耐塩型), Facultative (通性耐塩型), Obligate (偏性耐塩型) の3型とし、それぞれをさらに A (弱), B (中), C (強) の3亜型に分けている。

細菌の場合とは異なり、約18%の食塩を含む醤油諸味の酵母に対して、2%濃度で区切る FLANNERY 氏の分類は当てはまらない。著者の実験で得られた酵母の食塩耐性に INGRAM 氏の型を適用するとすれば、大部分は非耐塩型となり、*T. versatilis*, *T. etchellsii* だけが通性耐塩型として扱われることになる。しかし、INGRAM 氏の型は、非耐塩型とはいっても、例えばC亜型はかなりの高濃度まで食塩無添加の場合と同程度の生育を保持するもので明らかな耐塩型と見るべきであり、通性および偏性耐塩型はむしろ好塩型として取扱ってよい。著者の実験においては INGRAM 氏の非耐塩型 A に相当するものを嫌塩型、同 C に相当するものを耐塩型、通性耐塩型に入るものを好塩型とした。

生育と醗酵性に関する実験結果は、酵母の属、種によって食塩に対する態度が異なることを示すと同時に、約18%という諸味の食塩濃度が酵母の flora を著しく淘汰することを示し、主醗酵を行なう *Saccharomyces* 属酵母群および後熟に関与する *Torulopsis* 属酵母群をかなり明確に把握できたと思う。このような酵母群のとりえ方はいまだ行なわれたことがなく、従来の研究が、いわゆる醤油酵母と称された *Zygosaccharomyces saya*

などを含む *Saccharomyces rouxii* にのみ集中され、あるいは、酵母数の消長という漠然としたとらえ方しかできなかったために、醗酵の実態を把握することが困難であったのであり、このような生態学的な見方によってはじめて個々の酵母の意義を見出し得たといえる。

3. *Torulopsis versatilis* による糖類醗酵性

KLUYVER 氏^{222,223,224}) によるいわゆる醗酵の3則は、1) 醗酵性を有するものはグルコースを醗酵する、2) グルコースを醗酵するものはフラクトース、マンノースを醗酵する、3) マルトースを醗酵するものはラクトースを醗酵しない、また逆に、ラクトースを醗酵するものはマルトースを醗酵しない、というもので、今日尚引用されており、フラクトース、マンノースの醗酵性は LODDER 女史⁸¹⁾ の分類の検査項目から外されているほどである。

グルコース、ガラクトース、サッカロース、マルトース、ラクトース、およびラフィノースを醗酵し得る *Torulopsis versatilis* は、この点で特異な酵母である。

この酵母は ETCHELLES 氏²¹⁷⁾ がきゅうりの漬物汁から分離して、最初 *Brettanomyces vesratilis* として記載したが、酸生成の少ないことを理由に LODDER 女史⁸¹⁾ によって *Torulopsis* に編入されている。その醗酵性については ETCHELLES 氏らによると、サッカロースは6日後、メリピオース、ラフィノースは12日後にそれぞれ“maximum”に達する醗酵を示したとしており、インベルターゼ、メリビアーゼ両活性を持っていたことが分る。LODDER 女史らはこれを再検討してメリビアーゼ活性を認めず、ラフィノースは1/3を醗酵するがしばしば微弱であるとしている。

これらを考え合わせると、*T. versatilis* のインベルターゼ、メリビアーゼは、ともに弱いか、不安定なもののように見受けられる。実際に、粗酵素液について見ると、インベルターゼの存在は確められたが、両酵素の活性は菌株によってかなり異なるばかりでなく、食塩によっても影響されることが分り、サッカロース、ラフィノースの醗酵性の不安定な理由も一部はこの点にあると考えられた。

サッカロース、ラフィノースの醗酵性が低い最も大きな原因は、この酵母がフラクトースを分解し得ないという特異性にあることが明らかとなった。このことについてはまだ報告がなく、*T. versatilis* は KLUYVER 氏 の原則から大きくはみ出した特異な酵母と考えられ、高濃度の食塩が影響しているように思われる。

4. 醬油諸味酵母のフラクトース醗酵性と同化性

醬油諸味酵母について全般的な実験結果から、フラクトースを分解し得ないという特性が *T. versatilis* など好塩性、耐塩性の *Torulopsis* 属酵母の大部分に共通して認められ、種についてはほぼ一定であることが明らかとなった。

酵母は一般に、グルコースと同様にフラクトースもよく利用する、とされている。これは、両糖がよく似た化学構造をもっているために、細胞内への取り込みや分解に同じ機構が働らくため、と考えられている。

しかし、耐塩性、あるいは耐浸透圧性の酵母では、フラクトースの方をよく利用する、との報告があり、この場合は、栄養微量要素が影響している^{89,90,95,96,97,107}) あるいは、細胞表層部分に、浸透圧に対する抵抗性ととともに糖類の選択性がある^{242,243})、などを理由としている。好塩性の *T. versatilis*、その他がフラクトースを分解し得ないことは、これらによっては説明できないが、この酵母にも、特殊な物質透過の機構があることは推測できる。

一方、酵母のグルコース分解は、主として、EMBDEN-MEYERHOF 経路を通して行なわれるとされているが、“pentose phosphate cycle” が共存することも知られており^{244~248})、この経路は、酵母の種類や細胞の老若によっては前者より多い場合がある^{244,245}) ほか、好気条件で培養した酵母^{244,247})、あるいは好塩性酵母²⁴⁶) で、この経路が主となることが報告されている。

したがって、好塩性の *T. versatilis* などにおいても“pentose phosphate cycle” が重要な役割をもつことが考えられる。

このほか、細菌においては、ENTNER-DOUDOROFF 経路、および“phosphoketolase”経路があって、いずれもフラクトースを経ないで分解されるが、特に後者は“phosphofruktokinase”がない場合の経路であり、好塩性酵母に phosphofruktokinase がなかった、との報告²⁴⁶) もあるので、好塩性 *T. versatilis* などでは、この経路を通る可能性が考えられる。

グルコースを分解してフラクトースを分解しない微生物としては、このほかに *Nocardia asteroides* に関する報告²⁴⁹) があり、この場合には、フラクトースの利用性の菌から“transport system”の変異によってできたもの、と解釈している。

5. *Saccharomyces* 属および *Torulopsis* 属酵母の分別計数

大西氏²¹⁶⁾ は *S. rouxii* が18% 食塩を含むグルコース

培地では生育するが、同濃度に食塩を含むマルトース培地では生育しないと、茂木氏ら²⁵⁰⁾はこの点を利用して、醤油諸味中の酵母について動態を調査する方法を報じた。しかし、酵母によるマルトースの分解が少なくとも3つの遺伝子によりコントロールされていることは周知のことであり、そのためにおこる醗酵性、同化性の不安定性についても、SCHEDA 氏ら²³⁸⁾が詳細な研究によって指摘しているところで、特に茂木氏らが使用した18%という食塩濃度が共通性をもつかどうかの疑問とともに、実際に当ってこの濃度を正しく保持できるかどうかなど危惧が感ぜられる。この点について著者の分離した *S. rouxii* は、試験した限りにおいて食塩25%存在下でもマルトースを例外なく醗酵していることを特記せねばならない。

茂木氏らはまた、フラクトース利用性の差による著者の方法では、*S. rouxii* を分別計数できないとしているが、北海道産醤油諸味の場合、フラクトース利用性の差が属、種について根本的な性格である点で、不安定なマルトース分解性と異なることと、生態的には、*S. rouxii* と性質類似の *S. cerevisiae*, *T. sake* を一括した *Saccharomyces* 属酵母群として主醗酵の役割を果していると解釈しており、これらと後熟に関与する *Torulopsis* 属酵母群とを分別することに意義があるので、*S. rouxii* に固執する必要はない。

この実験では特に後熟酵母として品質に重要な影響を与えるこれら *Torulopsis* 属酵母群の動向を充分把握することに重点をおいた。さらにまた、*T. etchellsii* に焦点を合わせて、栄養等の条件がかなり満足されても温度に敏感なことを知り、これを利用して、*Saccharomyces* 属酵母とは勿論、後熟酵母の一つと見られる *T. versatilis* とも分別できることを確めた。

T. etchellsii が *Saccharomyces* 属酵母の自己消化液によって増殖を促進されることは新たな特徴であり、生態学的にも甚だ興味深い現象である。

6. 純粋培養酵母の添加による醗造試験

醤油諸味醗酵における酵母の重要性は、第2次大戦後、佐々木氏²⁵¹⁾、佐合氏⁷⁹⁾によって指摘されたが、従来の研究が *S. rouxii* による主醗酵、乳酸菌による香味醸成などに向けられ、その熟成過程はなお不明のままであった。このことは、酵母を *S. rouxii* としてとらえ、あるいは単に酵母として一括するだけで、その内容について理解し得なかったことに起因している。

この実験では、仕込後、いわゆる混入雑酵母が速やかに淘汰された後、温度上昇とともに主醗酵酵母 *Saccha-*

romyces の増殖が旺盛となり、温度が下降し、*Saccharomyces* 属酵母群の菌数が低下するのと入れ違いに好塩性の *Torulopsis* 属酵母群が増加するという明らかな消長があり、これによって熟成の進むことが明らかとなった。さらに、添加した純粋培養酵母はほぼよく増殖して、それぞれの特性を現わし、*T. versatilis* および *T. etchellsii* の添加により諸味品質が向上すること、ことに *T. etchellsii* の添加は諸味の香気、風味を格段に良くすることが確められた。*Saccharomyces* 属酵母が旺盛に増殖した後下降し、これと入れ違いに *Torulopsis* 属酵母が増殖するという傾向は、*T. etchellsii* が *Saccharomyces* 属酵母の自己消化液によって増殖を促進されるという特徴によって理解できる。このことによって熟成に対する *Saccharomyces* 属酵母の意義が明確になったと考えられ、*T. etchellsii* を諸味中において増殖させるには、*Saccharomyces* 属酵母の著しい増殖と、その後の速やかな崩壊とが重要な鍵になると見られる。

したがって、諸味醗酵において優れた品質を得るためには、純粋培養の添加とともに、初期の高温による *Saccharomyces* 属酵母群の増殖促進と、その後、低温に移しての細胞崩壊促進、これを利用する *Torulopsis* 属酵母、ことに *T. etchellsii* の増殖促進をはかる必要がある、温度管理による影響を重視しなければならない。

総 括

北海道産醤油諸味の品質向上をはかる目的で、広く北海道内35工場の諸味試料をあつめ、酵母を分離してこれを分類同定し、その分布と品質との関連性を明らかにした。次いでこれら酵母の食塩に対する態度をしらべてそれぞれの諸味中における役割を推察し、さらに熟成過程に重要と思われる酵母について醗酵性、同化性、生育条件などを把握した上、その特徴を利用した分別計数法を考案し、これらを応用して、純粋培養添加による小規模な醸造を行ない、酵母群の消長を明らかにし、また、好塩性 *Torulopsis*、特に *Torulopsis etchellsii* の著しい添加効果を確認、優れた品質の諸味とする可能性を生態学的に明らかにした。

得られた結果を総括すると次のようになる。

1. 北海道内35工場の諸味試料から分離した酵母は総数742株で、これらは分類学的検索の結果、次のように新種 *Debaryomyces halotolerans* を含む7属23種となった。

Saccharomyces cerevisiae HANSEN.
S. rouxii BOUTROUX.

S. fructuum LODDER et KREGER-VAN RIJ.
S. bisporus (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
S. mellis (FABIAN et QUINENT) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
Debaryomyces halotolerans SASAKI et YOSHIDA.
Hansenula anomala (HANSEN) H. et P. SYDOW.
H. subpelliculosa BEDFORD.
Sporobolomyces roseus KLUYVER et VAN NIEL.
Torulopsis sake (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
T. gropengiesseri (HARRISON) LODDER.
T. bacillaris (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.
T. famata (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
Torulopsis versatilis (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ.
T. anomala LODDER et KREGER-VAN RIJ.
T. etchellsii LODDER et KREGER-VAN RIJ.
T. magnoliae LODDER et KREGER-VAN RIJ.
T. nodansensis ONISHI.
Candida tropicalis (CASTELLANI) BERKHOUT.
C. guilliermondii (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA.
C. parapsilosis (ASHFORD) LANGERON et TALICE.
C. solani LODDER et KREGER-VAN RIJ.
Rhodotorula mucilaginosa (JÖRGENSEN) HARRISON.

2. このうち、わが国古来の醤油酵母を含む *S. rouxii* と、サッカロース醗酵性を示す以外はこれと性格を一にする *S. cerevisiae*, この胞子形成能を失なった形と見られる *T. sake*, の3者は、その類縁性から *Saccharomyces* 属酵母群として一括したが、これらは蒐集試料中に最も広く、かつ多量に分布しており、食塩濃度20%前後でも旺盛に生育する耐塩性をもち、強い醗酵性を有することから諸味の主醗酵を行なうものと解釈された。

3. *T. versatilis* および *T. etchellsii* は *Saccharomyces* 属酵母群に次いで広く、多い分布を示したが、好塩性であり、いわば好塩性の *Torulopsis* 属酵母群として一括できるが、高濃度の食塩を含む糖液をも徐々に醗酵する能力をもち、その培養が芳香を有することから、後熟酵母として諸味熟成に関与するものと見られた。

4. その他、耐塩型の生育を示す酵母としては *S. bisporus*, *D. halotolerans*, *T. bacillaris*, *C. solani* があり、好塩型に属するものとして *S. mellis*, *T. gropengiesseri*, *C. tropicalis* があり、*Sporobolomyces roseus*, *T.*

anomala, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* が耐塩性をもたない嫌塩型であった。これらは、いずれもその分布が地域的にも量的にも限られていて、諸味に対して影響を与えるとは考えられない。

5. *T. versatilis* のサッカロース、ラフィノースの醗酵性が異常に低いことが分ったが、これは、インベルターゼとメリビアーゼ活性の不安定性にもよるが、その1株について精査した結果、最も大きな原因としてフラクトース醗酵性がないという特異性が明らかとなった。この特徴は、塩類、滲透圧、pH などによって変わるものでなく、この酵母の本質的な欠陥と解釈された。

6. フラクトース分解能をもたないという特性は、供試した *T. versatilis* 全菌株(31株)について共通して見られるばかりでなく、好塩性の *S. mellis* (4株), *T. gropengiesseri* (16株), *T. etchellsii* (11株), 耐塩性の *T. bacillaris* (2株), *T. famata* (3株), *T. magnoliae* (13株) にも共通して認められ、フラクトース醗酵性、同化性を明瞭に示す *Saccharomyces* 属酵母群やその他の *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* 各属酵母とは本質的に区別されることが明らかとなった。

7. 主醗酵を行なう *Saccharomyces* 属酵母群と熟成に関与する好塩性の *Torulopsis* 属酵母群とは、共に高濃度食塩培地で生育し、前者がフラクトースを同化し、硝酸カリを同化しないこと、後者がフラクトースを同化せず、硝酸カリを同化すること、の特性を利用してそれぞれの選択培地を考案し、これによって純粋培養は勿論、諸味中でのこれら酵母群の消長を計測することが可能となった。

8. *T. etchellsii* は、ペプトン、麴汁、酵母エキスとともに *Saccharomyces* 属酵母群の自己消化液により著しい生育促進をうけることが明らかとなった。また、培養の最適条件で *Saccharomyces* 属酵母群や *T. versatilis* が37°Cで充分良好に生育するのに対し、*T. etchellsii* は、32°C以下でよく生育するが37°Cでは全く生育し得ないことが確かめられ、この点を利用することによって諸味中での *T. etchellsii* の動向を把握することが可能となった。

9. *S. rouxii*, *S. cerevisiae*, *T. versatilis* および *T. etchellsii* の4菌株(いずれも醤油諸味から分離したもの)の純粋培養を、仕込初期に添加した諸味を、醗酵槽中の仕込諸味中に沈める方法で、小規模な醸造試験を行ない、酵母の消長、品質への影響を見た結果、混入雑酵母が早期に淘汰された後、温度の上昇とともに *Saccharomyces*

属酵母群が著しく増加して主醸酵を行ない、その後、温度の下降とともに急激に減少し、これと入れ違いに好塩性の *Torulopsis* 属酵母群が増加するという一般的な傾向が認められ、この間に、*Saccharomyces* 属酵母群細胞の崩壊とこれを利用した *Torulopsis* 属酵母群の増加という交代現象が明らかに認められた。

添加した酵母は概して順調に生育すると同時に、それぞれの特性を示し、好塩性の *Torulopsis* 属酵母群を添加した諸味は品質がよく、特に *T. etchellsii* の添加、増殖した諸味は格段に優れた品質となることが確かめられた。

10. したがって、諸味醸造においては、早期に温度を 30°C 前後に保って *Saccharomyces* 属酵母群の増殖を促し、その後、低温に移して *Torulopsis* 属酵母群の増殖をはかることが品質向上の重要な鍵となると思われ、*Torulopsis* 属酵母群、とりわけ *T. etchellsii* の添加利用とともに温度管理に対する留意が必要と考えられた。

文 献

- 1) 磯野徳三郎：東化 3, 1-11 (1882).
- 2) 田原良純：薬学, 明 20, 80-89 (1887).
- 3) 田原良純・喜多尾元英：衛生試 3, 63-71 (1888).
- 4) 平野猪之助：薬学, 明 21, 72-73 (1888).
- 5) 古川 栄：東化 11, 雑録 15 (1890).
- 6) 西村栄十郎：東農学報 3, 191-206 (1897).
- 7) SAITO, K.: Botanical Magazine, Tokyo, 19, No. 222, 75-77 (1905).
- 8) SAITO, K.: Centralbl. f. Bakteriologie, Parasit., Abt. II, 17, 20-27, 101-109, 152-161 (1906).
- 9) SAITO, K.: Botanical Magazine, Tokyo, 23, No. 268, 96 (1909).
- 10) 西村寅三：農会 83, 11-52 (1908).
- 11) ————：農会 85, 3-44 (1909).
- 12) ————：農会 98, 18-50, 99, 1-60, 100, 33-62 (1910).
- 13) ————：東京税務監督局, 内国税彙纂 45-47 号 (1910).
- 14) ————：醸協 7(4), 1-8, 7(5), 5-14, 7(6), 11-24 (1912), 農会 115, 1-28, 116, 1-24 (1912).
- 15) 満田隆一：農会 96, 43-54 (1910).
- 16) 喜多源逸：工化 14, 109-128 (1911).
- 17) 高橋偵造・湯川又夫：農会 112, 1-25 (1911).
- 18) ————：東農紀 5, 227-261 (1915).
- 19) TAKAHASHI, T. and M. YUKAWA: J. Coll. Agr., Tokyo Imp. Univ. 5, 227-261 (1915).
- 20) 吉田武郎：北大農学部卒論 (1911).
- 21) ————：札農 13, 1-27 (1912).
- 22) 山本 亮：北大農学部卒論 (1915).
- 23) 高橋徳吉：東大化 19, 787-803 (1893).
- 24) 梶野明二郎：醸協 5(3), 1-23 (1910).
- 25) ————：醸協 5(4), 13-28 (1910).
- 26) ————：醸協 5(5), 1-15 (1910).
- 27) ————：醸協 5(7), 1-14 (1910).
- 28) 木下浅吉：醸協 19(3), 11-14 (1924).
- 29) 宮路憲二：農化 3, 914-918 (1927).
- 30) 松本憲治・陳開 勲・佐野善兵衛：醸協 22(8), 26-30 (1927).
- 31) ————：醸協 22(9), 30-37 (1927).
- 32) ————：醸協 22(10), 18-25 (1927).
- 33) ————：醸造試報 99, 1-187 (1928).
- 34) 松本憲治：醸協 24(1), 23-31 (1929).
- 35) ————：醸協 24(2), 18-23 (1929).
- 36) 石丸義夫：農化 9, 859-904, 953-1004, 1143-1174 (1933).
- 37) 村津俊太郎：北大農学部卒論 (1934).
- 38) 木下浅吉：醸造試報 91, 232-248 (1923).
- 39) 木下浅吉：醸協 18(2), 4-8 (1923).
- 40) 西村寅三・木下浅吉・勝山百寿：醸造試報 92, 408-416 (1924).
- 41) 黒野勘六・木下浅吉・深井冬史・館野正淳：醸協 22(10), 1-8, 22(11), 6-9, 22(12), 11-24 (1927).
- 42) ————：醸協 23(1), 13-26 (1928).
- 43) ————：醸造試報 102, 50-62 (1929).
- 44) 黒野勘六・長橋 清・鳥山四郎：醸協 30, 100-108 (1935).
- 45) 伊藤定治：醸協 7(10), 21-24 (1912).
- 46) 梶野明二郎：醸協 8(2), 28-31 (1913).
- 47) 安藤信成：北大農学部卒論 (1920).
- 48) 松本憲治：醸協 19(8), 15-18 (1924).
- 49) ————：醸協 19(9), 23-25 (1925).
- 50) 松本憲治・出井真平：醸造試報 115, 175-181 (1932).
- 51) ————：醸造試報 115, 187-192 (1932).
- 52) ————：醸造試報 122, 175-191 (1935).
- 53) 松本憲治：醸協 34, 873-883 (1939).
- 54) 梶野明二郎：農会 109, 1-5 (1911).
- 55) 永木暁三郎：醸協 8(8), 63-66 (1913).
- 56) 小玉新太郎：日化 43, 948-956 (1922).
- 57) ————：日化 43, 956-981 (1922).
- 58) 平 友恒：農化 2, 734-741 (1925).
- 59) 庄司謙次郎：農化 3, 1126-1136 (1927).
- 60) 庄司謙次郎・小貫 基：理研報 11, 277-283 (1932).

- 61) 庄司謙次郎：理研報 **14**, 872-877 (1935).
 62) —————：理研報 **15**, 166-170 (1936).
 63) —————：理研報 **15**, 223-229 (1936).
 64) 黒野勘六・深井冬史：醸造試報 **97**, 1-75 (1928).
 65) 山田正一：農化 **4**, 666-672 (1928).
 66) —————：農化 **5**, 223-233 (1929).
 67) 赤堀四郎：日化 **57**, 828-831 (1936).
 68) —————：日化 **57**, 832-836 (1936).
 69) 木原 清：工化 **43**, 313-314 (1940).
 70) —————：工化 **43**, 876-883 (1940).
 71) 石川義夫：醸造学雑誌 **13**, 295-320 (1935).
 72) 茂木正利・中島茂次・安藤貴夫：醸工 **29**, 317-321 (1951).
 73) —————：醸工 **30**, 49-59 (1952).
 74) 茂木正利・安藤貴夫・中島茂次：醸工 **30**, 152-159 (1952).
 75) —————：醸工 **30**, 194-199 (1952).
 76) 茂木正利・大西 博：醸工 **33**, 396-403 (1955).
 77) 森田太郎：北大農学部卒論 (1952).
 78) 石川義勝：北大農学部卒論 (1953).
 79) 佐合 努：北海道味噌醬油研究所試験成績書，第3報，1-13 (1953).
 80) 矢内次郎・滝田啓三・雨宮清司：調味科学 **3**(4), 18-22 (1955).
 81) LODDER, J. and N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The Yeasts, A taxonomic study. (1952), North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
 82) 小原 巖・野々村英夫：農化 **28**, 122-125, 160-165, 717-721, 721-724, 837-840, 886-889 (1954).
 83) 大西 博：野田醬油研究所報告，第1輯，16-35 (1957).
 84) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **21** (3), 151-156 (1957).
 85) 清水 剛：広島食品工試 **1**, 13-17 (1953).
 86) —————：広島食品工試 **1**, 18-20 (1953).
 87) 山田一弥・古坂澄石・植村定治郎：調味科学 **1**(3), 14-19 (1953).
 88) 香川県醬油試験場：香川醬試 **48**, 1-6 (1955).
 89) 佐藤正弘・山田一弥・植村定治郎：農化 **30**, 492-496 (1956).
 90) 佐藤正弘・植村定治郎：農化 **30**, 497-501 (1956).
 91) —————：醬油と技術，166号，3-4 (1957).
 92) —————：醬油と技術，167号，1-3 (1957).
 93) —————：醬油と技術，168号，3-4 (1957).
 94) 植村定治郎：調味科学 **5**(3, 4), 96-100 (1957).
 95) 佐藤正弘・植村定治郎：農化 **32**, 79-82 (1958).
 96) —————：農化 **33**, 13-18 (1959).
 97) —————：農化 **33**, 18-22 (1959).
 98) 佐藤正弘・小嶋尚夫・男沢照子・斎藤恭子・植村定治郎：農化 **31**, 675-679 (1957).
 99) 佐藤正弘・斎藤恭子・植村定治郎：農化 **31**, 680-685 (1957).
 100) 男沢照子・小嶋尚夫・植村定治郎：農化 **31**, 738-743 (1957).
 101) 今原広次・原田芳裕・中浜敏雄：西京大(農) **9**, 78-82 (1957).
 102) 今原広次・原田芳裕・中浜敏雄・萬 雄治：西京大(農) **10**, 8-13 (1958).
 103) 中浜敏雄・今原広次：農化 **33**, 949-956 (1959).
 104) —————：醸工 **39**, 608-613 (1961).
 105) —————：醸工 **39**, 614-616 (1961).
 106) 竹田良作・平地 豊・池辺日出男：小豆島産研 **2**, 2-17 (1958).
 107) 照井逸造・佐瀬 勝：阪大工 **5**, 229-238 (1955).
 108) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **23**, 232-239 (1959).
 109) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **23**, 351-358 (1959).
 110) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **23**, 359-363 (1959).
 111) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **24**, 126-130 (1960).
 112) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **24**, 131-140 (1960).
 113) ONISHI, H., N. SAITO and I. KOSHIYAMA: Agr and Biol. Chem., **25**, 124-130 (1961).
 114) ONISHI, H. and N. SAITO: Agr. and Biol. Chem., **25**, 768-772 (1961).
 115) ONISHI, H.: Agr. and Biol. Chem., **25**, 341-349 (1961).
 116) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **24**, 226-230 (1960).
 117) ONISHI, H.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **24**, 386-396 (1960).
 118) 堂本康彦・西村敏藏・森永隆正・小松幸男：広島食品工試 **6**, 71-72 (1961).
 119) 好井久雄・中野正弘：醸工 **34**, 361-365 (1956).
 120) 山里一英・相羽富夫・後安正夫：調味科学 **8**, 17-25 (1960).
 121) 町 美根子：調味科学 **13**, 1-16 (1966).
 122) 国中 明：農化 **30**, 787-791 (1956).
 123) 石塚善太郎・斎藤伸生・梅田勇男：調味科学 **1**, 29-40 (1953).

- 124) 青山虎彦・高橋健也：茨城大農 **2**, 61-62 (1954).
 125) 青山虎彦・浅川幹次：茨城大農 **2**, 55-59 (1954).
 126) 藤原耕三・田中惠隆・藤田栄子：醗工 **40**, 321-327 (1962).
 127) 藤原耕三・徳田 睦・難波敦子：醗工 **40**, 327-332 (1962).
 128) 藤原耕三・石川 浩・難波敦子：醗工 **40**, 384-389 (1962).
 129) 石上有造・石川 浩・藤原耕三・上田隆蔵：醗工 **43**, 121-127 (1965).
 130) 竹内徳男・加藤 照・好井久雄：醗工 **40**, 379-384 (1962).
 131) 大西 博・斎藤成正：醗工 **37**, 457-461 (1959).
 132) 原田芳裕・朝家 昭：調味科学 **3**, 15-18 (1955).
 133) 黒島嘉雄：香川醬試 **49**, 12-16 (1956).
 134) 後安正夫：調味科学 **5**, 1-6 (1957).
 135) 上田隆蔵・永井史郎・森口繁弘：醗工 **37**, 94-99 (1959).
 136) ————：醗工 **37**, 99-104 (1959).
 137) 上野喬宏：農化 **35**, 458-464 (1961).
 138) 上田隆蔵・永井史郎・藤原一隆・森口繁弘：醗工 **42**, 88-92 (1964).
 139) ————：醗工 **42**, 93-97 (1964).
 140) 石上有造・石川 浩・森口繁弘・上田隆蔵：醗工 **43**, 110-114 (1965).
 141) ————：醗工 **43**, 115-120 (1965).
 142) 森本茂美・坂口八代子・村上充代：醗工 **45**, 17-21 (1967).
 143) 香川県醬油試験場：香川醬試 **48**, 6-14 (1955).
 144) 坂口健二・倉持央明：調味科学 **6**, 22-30 (1958).
 145) SAKAGUCHI, K.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **23**, 22-28 (1959).
 146) 山里一英・飯塚 広：農化 **33**, 379-382 (1959).
 147) 飯塚 広・山里一英：農化 **33**, 383-388 (1959).
 148) 上野照雄・大亦正次郎：醗工 **39**, 360-370 (1961).
 149) 上野照雄・川合真保子・大亦正次郎：醗工 **39**, 383-390 (1961).
 150) 中浜敏雄・今原広次・岩井正憲・萬 雄治：醗工 **42**, 746-754 (1964).
 151) 今井誠一・鈴木熊雄：醸協 **62**, 1225-1229 (1967).
 152) 村田清淳・竹田良作：調味科学 **7**, 1-12 (1959).
 153) 村田清淳・池辺日出男・竹田良作：調味科学 **9**, 11-23 (1961).
 154) SAKAGUCHI, K.: Bull. Agr. Chem. Soc., Japan, **23**, 100-106 (1959).
 155) 本間伸夫・今井誠一・田代友蔵・桑原美智子：調味科学 **11**, 12-19 (1964).
 156) 芳賀 宏・菅原孝志・佐々木重夫：調味科学 **12**, 14-24 (1965).
 157) 好井久雄：食品と科学 **9**, 28-32 (1967).
 158) 佐藤正弘・植村定治郎：農化 **32**, 79-82 (1958).
 159) 松山正宣・立瀬喜和子：醗工 **43**, 807-813 (1965).
 160) 横塚 保：農化 **23**, 200-205 (1949).
 161) ————：農化 **24**, 355-409 (1950).
 162) ————：農化 **27**, 359-363 (1953).
 163) ————：農化 **27**, 549-553 (1953).
 164) 中島 稔：Saiensu **1**, 20-22 (1947).
 165) 山田正一：香料 **2**, 15-17 (1948).
 166) 山田正一・広瀬竜也：醸協 **46**, J 37-J 43 (1951).
 167) 森本茂美・村上充代：醗工 **44**, 467-475 (1966).
 168) ————：醗工 **44**, 476-482 (1966).
 169) 今原広次・中浜敏雄：醗工 **46**, 876-884 (1968).
 170) 横塚 保：農化 **25**, 206-210 (1952).
 171) ————：農化 **25**, 401-405 (1952).
 172) ————：農化 **25**, 446-450 (1952).
 173) ————：農化 **27**, 276-281 (1953).
 174) ————：農化 **27**, 334-339 (1953).
 175) ————：農化 **28**, 114-118 (1954).
 176) ————：農化 **30**, 66-71 (1956).
 177) ————：農化 **32**, 23-26 (1958).
 178) 浅尾保夫・横塚 保：農化 **32**, 617-622 (1958).
 179) ————：農化 **32**, 622-628 (1958).
 180) 奥原 章・横塚 保：農化 **35**, 447-454 (1961).
 181) ————：農化 **37**, 255-261 (1963).
 182) 浅尾保夫・横塚 保：農化 **35**, 831-837 (1961).
 183) ————：農化 **35**, 837-845 (1961).
 184) ————：農化 **35**, 1211-1218 (1961).
 185) ————：農化 **37**, 563-568 (1963).
 186) ————：農化 **37**, 569-575 (1963).
 187) 横塚 保・逆井利夫・浅尾保夫：農化 **41**, 428-433 (1967).
 188) ————：農化 **41**, 434-441 (1967).
 189) 横塚 保・浅尾保夫・逆井利夫：農化 **41**, 442-447 (1967).
 190) 小幡弥太郎・小西 貞：農化 **24**, 226-229 (1950).
 191) ————：農化 **24**, 334-338 (1950).
 192) ————：農化 **24**, 479-481 (1950).
 193) 小幡弥太郎・坂村貞雄・山西 貞：農化 **25**, 8-12 (1951).
 194) 山西 貞・小幡弥太郎・佐野道司：農化 **26**, 125-128 (1952).
 195) 山西 貞・小幡弥太郎：農化 **27**, 657-659 (1953).
 196) ————：農化 **27**, 660-661 (1953).
 197) HANSEN, E. CHR.: Cent. f. Bakt., Abt. II.

- 12, 529-538 (1904).
- 198) KLÖCKER, ALB.: *Cent. f. Bakt., Abt. II.* **35**, 369-374 (1912).
- 199) STELLING-DEKKER, N. M.: *Die sporogenen Hefen. Verhandl. Koninkl. Akad. Wetenschap. Afd. Naturkunde, sect II,* **28**, 1 (1931).
- 200) KLÖCKER, A.: *Die Gärungsorganismen.* 3te Aufl., Berlin-Wien. (1924).
- 201) GUILLIERMOND, A.: *Clef dichotomique pour la détermination des levures.* Paris (1928).
- 202) DI MENNA, M. E.: *J. Gen. Microbiol.,* **10**, 65-67 (1954).
- 203) CAPRIOTTI, A.: *Archiv. f. Mikrobiol.* **28**, 344-348 (1958).
- 204) KROEMER, K. and KRUMBHOLZ: *Archiv. f. Mikrobiol.* **2**, 352-410 (1931).
- 205) KARAMBOLOFF, N. and G. KRUMBHOLZ: *Archiv. f. Mikrobiol.* **3**, 113-121 (1932).
- 206) 長西広輔: *植物学雑誌*, 365号, 107-115 (1917).
- 207) BEIJERINCK, M. W.: *Cent. f. Bakt., Apt. II.* **20**, 641-650 (1908).
- 208) FABIAN, F. W. and H. H. HALL.: *Zent. f. Bakt., Abt. II.* **89**, 31-47 (1933).
- 209) BEDFORD, C. L.: *Mycologia*, **34**, 628-649 (1942).
- 210) SASAKI, Y. and T. YOSHIDA: *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.,* **51**, 194-220 (1954).
- 211) KLUYVER, A. J. and C. B. VAN NIEL: *Cent. f. Bakt., Abt. II.* **63**, 1-20 (1924).
- 212) SAITO, K.: *Japan J. of Botany.* **1**, 1-54 (1922).
- 213) 斎藤賢道・小田雅夫: *醸造学雑誌* **12**, 159-174 (1934).
- 214) SKINNER, C. E.: *HENRICI's Molds, Yeasts and Actinomycetes.* 2nd Ed., New York (1947).
- 215) KRUMBHOLZ, G.: *Archiv. f. Mikrobiol.,* **2**, 601-619 (1931).
- 216) LODDER, J.: *Die anaskosporogenen Hefen. I Hälfte. Verhandl. Koninkl. Akad. Wetenschap. Afd. Natuurkunde, sect II,* **32** (1934).
- 217) ETCHELLS, J. L. and T. A. BELL.: *Farlowia*, **4**, 87-112 (1950).
- 218) 大西 博: *野田醬油研究所報告*, **II**, 1-111 (1961).
- 219) JÖRGENSEN, A.: *Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie.* 5te Aufl., Berlin. (1909).
- 220) 日本化学会編: *実験化学講座* **23**, 379, 384 (1957).
- 221) JEANES, A., C. S. WISE and R. J. DIMLER: *Anal. Chem.,* **23**, 415-420 (1951).
- 222) KLUYVER, A. J.: *Biochemische Suikerbepalingen, Delft.* (1914), p. 22 (N. M. STELLING-DEKKER: *Die Sporogenen Hefen* (1931), p. 11).
- 223) INGRAM, M.: *An Introduction to the Biology of Yeasts.* Sir Isac Pitman and Sons, Ltd. London (1955), p. 26.
- 224) PHAFF, H. J., M. W. MILLER and E. M. MRAK.: *The Life of yeasts.* Harvard Univ. Press (966), p. 72.
- 225) SCARR, M. P.: *J. Gen. Microbiol.* **5**, 704-713 (1951).
- 226) CONWAY, E. J. and M. DOWNEY.: *Biochem. J.* **47**, 347-355 (1950).
- 227) CONWAY, E. J. and F. DUGGAN.: *Biochem. J.* **69**, 265-274 (1958).
- 228) CONWAY, E. J. and T. G. BRADY.: *Biochem. J.,* **47**, 360-369 (1950).
- 229) PAYNE, W. J.: *J. Bacteriol.* **80**, 696-700 (1960).
- 230) RHODES, M. E. and W. J. PAYNE.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.,* **124**, 953-955 (1967).
- 231) 赤堀二郎: *酵素研究法 II*, 103, 104 (1956).
- 232) 日本化学会編: *実験化学講座* **24**, 204 (1958).
- 233) A. O. A. C.: *Shaffer-Somogyi method. Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemists.* 9th Ed. (1960), pp. 430-431.
- 234) LOCHHEAD, A. G. and G. B. LANDERKIN: *J. Bacteriol.* **44**, 343-351 (1942).
- 235) ROSE, A. H.: *J. Gen. Microbiol.* **31**, 151-160 (1963).
- 236) 土屋利男・中村秀雄・今井富雄: *日農化, 昭和42年開東支部会講演* (1967).
- 237) POWER, D. M. and S. W. CHALLINOR: *J. Gen. Microbiol.* **55**, 169-176 (1969).
- 238) SCHEDA, R. and D. YARROW: *Archiv. f. Mikrobiol.* **55**, 209-225 (1966).
- 239) FLANNERY, W. L.: *Bacteriol. Rev.* **20**, p. 49-66 (1956).
- 240) INGRAM, M.: *Microbial Ecology,* Cambridge Univ. Press, London (1957), p. 90-133.
- 241) PHAFF, H. J., M. W. MILLER and E. M. MRAK.: *The Life of Yeasts.* Harvard Univ. Press. (1966), p. 71.
- 242) GOTTSCHALK, A.: *Biochem. J.,* **40**, 621-626 (1946).
- 243) PAYNAUD, E and S. DOMERCQ: *Ann. Inst. Pasteur.* **89**, 346-351 (1955).
- 244) BLUMENTHAL, H. J., K. F. LEWIS and S. WEINHOUSE: *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 6093-6097 (1954).
- 245) CLARK, D. S. and R. H. WALLACE: *Canad. J. Microbiol.* **4**, 43-54 (1958).
- 246) CHANG, S., H. WANG and L. YANG: *Wei*

- Sheng Wu Hsueh Pas 9, 334-343 (1963).
- 247) INGRAM, J. M. and W. A. WOOD: J. Bacteriol. 89, 1186-1194 (1965).
- 248) 大西 博: 醱酵協会誌 25, 1-12 (1967).
- 249) CERBÓN, J. and J. ORIGOZA-FERADO: J. Bacteriol. 95, 350-354 (1968).
- 250) 茂木恵太郎・茂木孝也: 農化 42, 466-470 (1968).
- 251) 佐々木西二: 醤油と微生物. 日本醤油協会編, 醤油と研究 (下), (1951), pp. 21-22.

Description of *Debaryomyces halotolerans* nov. sp.

Growth in malt extract: After 3 days at 25°C, cells are round to oval (1.5-6)×(2.4-7.2) μ, single or in pairs. A sediment and thin creeping, wrinkled pellicle is formed. After one month at 17°C, thin white, rugous and wrinkled creeping pellicle and creamy gray clayish sediment are present.

Growth on malt agar: After 3 days at 25°C, cells are round to oval (2-5)×(2-7.5) μ, single and in pairs. The steak culture after one month at 17°C, is filiform or plumose, rather flat, smooth and somewhat rugous, cretaceous surface, with undulate margin which is fringed by means of chainy or tree like formation of cells. Color changes from marguerite yellow to pale cinnamon pink.

Slide cultures: Slight development of small trees consisting of oval and somewhat elongated cells.

Sporulation: Heterogamous conjugation may precede ascus formation. Three to fours, usually four, round to oval spores are formed in an ascus. Spore usually contains an oil drop.

Fermentation:

Glucose +	Maltose -
Galactose weak	Lactose -
Sucrose weak	

Sugar assimilation:

Glucose +	Maltose +
Galactose +	Lactose -
Sucrose weak	

Assimilation of potassium nitrate: Absent.

Ethanol as sole source of carbon: Good growth with the formation of "Kahmhaut".

Osmotolerance: Good growth on Potato glucose agar containing 20% NaCl after 3 days at 25°C, and on 25% NaCl medium after a week. The growth on salted medium are cretaceous and rugous entirely.

Growth in litmus milk: Litmus changed to blue

and milk peptonized.

Summary

Taxonomic and ecological studies of many yeast strains isolated from soya mash samples of 35 factories in different parts of Hokkaido resulted in potential improvements in soya mashes produced in this area. The presence of the yeasts was correlated with quality of the mashes and with their ability to tolerate salt. Two species of *Saccharomyces* and three species of halophilic and halotolerant *Torulopsis* were found to be of importance to quality of mash. These species were divided into two groups. One group consisted of two species of *Saccharomyces* and one species of *Torulopsis*, all three notable for strong fermentation and halotolerance. The other group consisted exclusively of halophilic *Torulopsis* species characterized by their ripening effects upon the mash. These species were distinguished by ability to ferment and assimilate sugars and requirements for certain nutrients. The results of this study led to a differential culture method for separation of the *Torulopsis* group from other yeasts. Small batch fermentations using selected mixtures of pure strains produced successful soya fermentations. Changes in yeast flora during fermentation were clarified. An adventageous effect of the *Torulopsis* groups, especially of *T. etchellsii*, was confirmed.

The results obtained are summarized as follows.

1. A total of 742 strains isolated from soya mashes in Hokkaido were classified in the following 7 genera and 23 species, including a new species *Debaryomyces halotolerans*:

Saccharomyces cerevisiae HANSEN

S. rouxii BOUTROUX

**S. fructuum* LODDER et KREGER-VAN RIJ

S. bisporus (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ

**S. mellis* (FABIAN et QUINET) LODDER et KREGER-VAN RIJ

Debaryomyces halotolerans SASAKI et YOSHIDA

Hansenula anomala (HANSEN) H. et P. SYDOW

H. subpelliculosa BEDFORD

Sporobolomyces roseus KLUYVER et VAN NIEL

**Torulopsis sake* (SAITO et OTA) LODDER et KREGER-VAN RIJ

T. gropengiesseri (HARRISON) LODDER

**T. bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER

**T. famata* (HARRISON) LODDER et KREGER-VAN RIJ

T. versatilis (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ

**T. anomala* LODDER et KREGER-VAN RIJ

T. etchellsii LODDER et KREGER-VAN RIJ

T. magnoliae LODDER et KREGER-VAN RIJ

T. nadaensis ONISHI

Candida tropicalis (CASTELLANI) BERKHOUT

C. guilliermondii (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA

C. parapsilosis (ASHFORD) LANGERON et TALICE

C. solani LODDER et KREGER-VAN RIJ

**Rhodotorula mucilaginosa* (JÖRGENSEN) HARRISON

2. *Saccharomyces rouxii*, *S. cerevisiae* and *T. sake* were included in the same group, namely, *Saccharomyces* group, because of their closely resembling characters with the exceptions of negative or doubtful fermentation of sucrose in *S. rouxii* and absence of sporulation in *T. sake*. Since the *Saccharomyces* group was distributed abundantly in almost all samples and had characteristic halotolerance and strong fermentation ability, this group was considered of prime importance in soya mash fermentation.

3. *Torulopsis versatilis* and *T. etchellsii* were the next most widely distributed group of species. Both were halophilic and were able to ferment sugars slowly even in a medium containing 25% (w/v) of salt. These two species are characterized by their halophilic property and their ability to produce fragrance. They are believed to play an important role in the ripening process. *T. etchellsii* is especially common in mashes of excellent quality.

4. The species *S. mellis*, *T. gropengiesseri*, and *C. tropicalis* were noted as halophiles. *S. bisporus*, *D. halotolerans*, *T. bacillaris*, and *C. solani* were

recognized as halotolerants. *Sp. roseus*, *T. anomala*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, and *Rh. mucilaginosa* were halophobics.

As the distribution of these species in mashes was limited in respect to area and number, it was suggested that these species had little significance in the fermentation process.

5. *Torulopsis versatilis* showed remarkably little activity on sucrose and raffinose. This could be explained partly by the variable activity of both enzymes, invertase and melibiase, in this yeast. In addition, fructose is not decomposed by this species. This characteristic was proved to be fundamental in this species and not to be affected by kinds of salts, osmotic pressures or pH values.

6. The inability to decompose fructose was also recognized in other species of halophilic and halotolerant *Torulopsis*. *Saccharomyces* group and species of *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida* and red yeasts showed clear fermentation of this sugar.

7. Selective media were devised to distinguish the principal fermenting and ripening yeasts. Selectivity was based on halotolerance and ability or inability to assimilate fructose and potassium nitrate. Using this method there was good agreement with the known ratio of cells in the inoculum. The selective media could be used throughout the fermentation for distinguishing the various types present in the soya mash.

8. The addition of autolysates of *Saccharomyces* group cells as well as peptone, koji extract or yeast extract markedly stimulated the growth of *T. etchellsii* in salted medium. This yeast could grow only at temperatures lower than 32°C, in contrast to those species of *Saccharomyces* group and *T. versatilis* which could grow well at 37°C. The above facts assured the detection of *T. etchellsii*.

9. A small batch scale fermentation of soya mash was inoculated with *S. rouxii*, *S. cerevisiae*, *T. ver-*

* Seven species are reclassified by J. LODDER in The Yeasts, A taxonomic study (1970) as follows:

Saccharomyces fructuum → *S. chevalieri* GUILLERMOND

S. mellis → *S. bisporus* (NAGANISHI) LODDER et KREGER-VAN RIJ var. *mellis* (FABIAN et QUINET) VAN DER WALT

Torulopsis sake → *Candida sake* (SAITO et OTA) VAN UDEN et BUCKLEY

T. bacillaris → *T. stellata* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER

T. famata → *T. candida* (SAITO) LODDER

T. anomala → *T. versatilis* (ETCHELLS et BELL) LODDER et KREGER-VAN RIJ

Rhodotorula mucilaginosa → *Rh. rubra* (DEMME) LODDER

sativis and *T. etchellsii* to examine the changes in yeast flora and the quality of mash.

The following change of flora was observed: The rapid disappearance of the halophobics came first, and then in accordance with changes of temperature, an increase and decrease of *Saccharomyces* group, followed by a gradual increase of cells of halophilic *Torulopsis*. It is probably true that the autolysates of *Saccharomyces* group cells would be released after the diminution of cell numbers and would be utilized by halophilic *Torulopsis* group, especially by *T. etchellsii*, to achieve remarkable growth. It will also be noted that good growth of added yeasts in soya mash was commonly recognized.

Halophilic *Torulopsis* group, added to soya mash, markedly improved its quality. The addition of *T. etchellsii* gave a most desirable effect to mash quality.

10. From these results the following procedure will be recommended to improve the quality of mash: Pure cultures such as *T. etchellsii* are added to mash and mash is kept at rather high temperature during the first stage of fermentation to increase the growth rate of *Saccharomyces* group, then maintained at lower temperature to promote autolysis of cells of *Saccharomyces* group. Components of the autolysate enhances growth and activities of the halophilic *Torulopsis* group, especially *T. etchellsii*.