

[醸工 第43巻, 第7号, p.457~464, 1965]

Pediococcus soyae の培地組成について (第2報)

好井 久雄・細川 信男

(愛知県食品工業試験所)

Studies on the Composition of Culture Media for *Ped. soyae* (II)

Hisao Yoshii and Nobuo Hosokawa

(Institute of Food Technology, Aichi Prefecture, Shinfukuji, Nagoya)

In a previous report we confirmed that good growth of *Ped. soyae* was obtained in a medium containing soy-sauce.

This report deals with further study made on the application of soy-sauce as a growth medium and on the effect of pH adjustment during the growth culture.

The results obtained were as follows:

- 1) All the unpasteurized soy-sauces and soy-sauce koji extract were effective for the growth of *Ped. soyae* while chemically processed soy-sauce had little effect.
- 2) Consequently, it was shown that the peptone-yeast extract medium, which has been usually regarded as the most suitable for growth of *Ped. soyae*, can be substituted with a soy-sauce medium.
- 3) As was already known, good growth of *Ped. soyae* can generally be obtained by maintaining pH in the medium higher than 5.5 during incubation.

Better growth was observed in the medium with a larger buffer action.

A much higher cell crop was obtained by raising pH of the medium during incubation higher than 5.8 by the addition of alkali since the buffer capacity of the medium was still insufficient after the addition of Na-succinate.

- 4) In this experiment maximum growth indicated by the viable cell count was 10^9 /ml in soy-sauce medium (total nitrogen 0.4%), when pH was raised higher than 5.8.

緒 言

前報¹⁾において *Ped. soyae** の培養, 集菌のための効果的な培地組成を検討し, 生しょう油または生しょう油と酵母エキスなどの併用が好結果を得た。本報では生しょう油を基材とした培地組成をさらに詳細に検討し, あわせて培養時の pH 調節と増殖の関係についてのべる。

試 験 方 法

1. 生しょう油の調製 同一工場の仕込時から熟成迄の醸造期間のことなるしょう油諸味より液汁を採り,

* 本菌は中川ら²⁾, 坂口³⁾の見解によれば *Ped. halophilus var. soyae* と改めるのが妥当と思われるが, 前報¹⁾との関連から本報では原名を用いる。

一度煮沸した後濾紙にて濾過したものにつき全窒素 (T.N.) をケルダール法, 直糖をベルトランド法によって定量し, T.N. 濃度を規準に配合を行なった. 一部の試験に用いたしょう油麴抽出液はしょう油麴に約4倍量の水を加え, 50°C前後で3hr抽出後しょう油の調製と同様の処理を施した.

2. 試験培地の組成 前報¹⁾の結果に基づき食塩7%, 直糖1~1.5%, Na-succinate 0.15M**, pH7.0の組成を基本とし, しょう油などのN. 源の配合に当ってはそれらの中にふくまれる食塩, 直糖をさしひいて最終濃度をそろえた. Table 1 に培地組成を示す. 以下しょう油を基材とした培地をSS-培地, 従来本菌の常用培地としてよく使われているペプトン, 酵母エキスを基材とした培地をPY-培地と略称する. 緩衝剤としてのNa-succinateは0.15Mを一般的に用いたが, 試験の目的によって0.3M, または無添加とした.

3. 試験菌株の培養 *Ped. soyae* をPY-培地に前培養したものを1~2滴接種し, 試験管内(培地約6ml)で30°C, 6日以内培養した. 培養途中のpH修正を行なう際には, 300ml内外の培地を用いて経時的に10mlをぬきとり, pHメーターで7.0にもどすに必要なアルカリ液量を算出し, 5% NaOH溶液を用いた.

4. 増殖度, 生酸度の測定 菌体量は日立EPO-B型光電光度計を用いて各培地(N.濃度が高いものでは適宜稀釈)をブランクとして660m μ における透過率を測定して吸光度(-log T)を算出した. pHはガラス電極pHメーターにより, 生酸度は培地10mlをとり, 0.1NのNaOHでpH7.0まで中和するに要したアル

Table 1. Composition of medium.

SS	Soy-sauce medium	Glucose (final) 1~(1.5)%, NaCl (final) 7%, Soy-sauce T.N.* 0.1~0.8%, Na-succinate 0.15 M (usually) added as buffer agent, pH 7.0
PY	Peptone, yeast-extract medium	Glucose 1%, NaCl 7%. Peptone 1%, Yeast-extract 0.5%, (T.N. % of medium was 0.19%) Na-succinate 0.15 M (usually) added as buffer agent, pH 7.0

* T.N.: Total Nitrogen

Table 2. Analytical data of soy-sauce.

Kind of soy-sauce used	T. N. %	Reducing sugar %
Soy-sauce brewed for 1 month	1.00	1.05
Soy-sauce brewed for 2 months	1.16	4.44
Soy-sauce brewed for 3 months	1.25	4.43
Soy-sauce brewed for 9 months	1.47	2.17
Soy-sauce brewed for 13 months	1.73	3.21
Soy-sauce koji extract	0.17	1.05
Chemically processed soy-sauce	2.25	—

** 前報¹⁾のFig. 2~4の緩衝剤濃度(M)は印刷の誤りで0.5は0.05, 1.0は0.10, 1.5は0.15, 2.0は0.20(M)と訂正する.

カリ量 ml で示した。

5. 培地緩衝能の測定 培地 10 ml をとり, 島津自動電位差滴定装置で 0.1 NH₂SO₄ 溶液で pH を最終 4.0 まで下げ, この際の酸必要量から緩衝能を算出した。

実験結果および考察

1. 熟成度のことなる生しょう油使用培地における増殖

これまでの実験で生しょう油はすべて熟成溜しょう油を用いたが, 熟成度によって増殖促進効果がことなることも予想されるので, しょう油麴抽出液から熟成品にいたる種々の段階の生しょう油をえらび, 増殖度の比較を行なった。この際, 塩酸分解によるアミノ酸液 (味の素KKの市販味液) もあわせてテストした, Table 2 に用いた各生しょう油の分析値を示す。この T.N. % をもとに T.N. で 0.02~0.4% になるよう配合を行なった SS-培地における増殖度は Table 3 のごとくであり, 1) いずれのしょう油を用いても N. 濃度の増大に伴い増殖も良くなるが, 同一 N. 濃度における菌体量は麴抽出液, 味液を除いてどのしょう油でもほぼ類似している。すなわち仕込後 1~13ヶ月経過のどの生しょう油を用いても, N. 濃度が一定であれば増殖度は類似しており, また, 溜しょう油と普通しょう油の差も熟成品についてはみられない。2) 味液を用いた培地での増殖

Table 3. Growth (O.D.) of *Ped. soyae* in SS-medium supplemented with several kind of soy-sauce.

Kind of soy-sauce used	T. N. concentration (%) of soy-sauce				
	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4
Soy-sauce koji extract	0.37	0.48	0.53		
Soy-sauce brewed for 1 month	0.20	0.29	0.42	0.55	0.82
Soy-sauce brewed for 2 months	0.11	0.27	0.43	0.59	0.86
Soy-sauce brewed for 3 months	0.11	0.24	0.40	0.55	0.86
Soy-sauce brewed for 9 months	0.17	0.31	0.50	0.64	0.86
Soy-sauce brewed for 13 months	0.19	0.31	0.48	0.72	0.90
Chemically processed soy-sauce	0.05	0.10	0.11	0.20	0.29
Tamari soy-sauce	0.14	0.32	0.49	0.70	0.76

Table 4. Growth (O.D.) of *Ped. soyae* in PY-medium* supplemented with several kinds of soy-sauce.

Supplemented soy-sauce (T. N. %)	0.02	0.05	0.1	0.2
T. N. % of medium	0.21	0.24	0.29	0.39
Soy-sauce koji extract	0.47	0.55	0.55	
Soy-sauce brewed for 1 month	0.36	0.43	0.51	0.74
Soy-sauce brewed for 2 months	0.31	0.36	0.48	0.63
Soy-sauce brewed for 3 months	0.24	0.37	0.46	0.57
Soy-sauce brewed for 9 months	0.38	0.46	0.57	0.80
Soy-sauce brewed for 13 months	0.41	0.49	0.58	0.80
Chemically processed soy-sauce	0.20	0.22	0.29	0.38
Tamari soy-sauce	0.39	0.49	0.60	0.80

* The growth in basal PY-medium was 0.27 as O.D.

はいずれの N・濃度においても醸造生しょう油に劣り、ほぼ後者の $\frac{1}{3}$ 程度の増殖しか得られない。3) しょう油麴抽出液の加用は比較的低い N・濃度 (0.05~0.1%) で生しょう油より良い増殖が得られるが、さらに N・濃度を高めても増殖促進は少ないものと考えられる。この結果から熟成経過中麴に含まれる増殖因子の減少も予想され、麴抽出液の使用がもっとも有効ではないかとの推定もなりつつが、実際の操作として集菌のための透明な麴抽出液を調製することは煩雑 (未分解蛋白に由来する濁濁の除去が厄介) なので、実用上は熟成生しょう油を用いるのが便宜である。

つぎに前報⁷⁾で PY- 培地に生しょう油の配合により増殖が向上することをみとめたが、上記実験と同じく用いる生しょう油によりこの増殖促進効果がことなるかどうかを比較検討した。結果を Table 4 に示す。

1) SS- 培地におけると同様にしょう油添加量が増すにつれて高い増殖が得られ、T.N. で0.2% 配合においては SS-培地で T.N. 0.4% の際とほぼ類似した増殖がある。2) 同一 N・濃度補足の増殖促進効果は各生しょう油についてはほぼ類似しているが、熟成、または熟成に近い生しょう油 (9ヶ月経過) がややすぐれている。3) 味液添加では T.N. で0.2%を除いて、PY- 培地 (対照) より増殖が劣り、味液自体に何か生育阻害因子があるとみなされる。4) 麴抽出液は SS- 培地におけると同じく、比較的少量の加用で増殖促進効果は生しょう油よりも大きい。

以上を通じて同一 N・濃度の SS- 培地と PY- 培地へ生しょう油を配合した培地での増殖度は同等であり、結

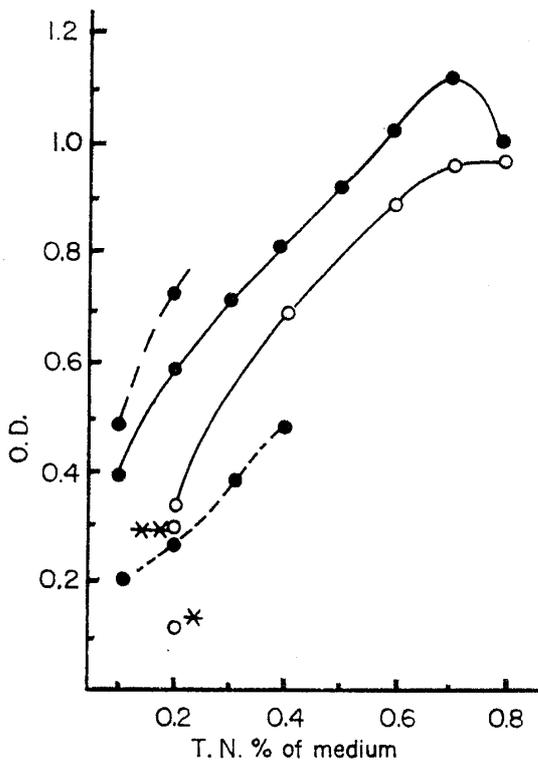


Fig. 1. Effect of soy-sauce concentration on growth of *Ped. soyaе*.

● SS-medium, ○ PY+soy-sauce-medium,
(* without buffer agent, ** containing Na-succinate 0.3 M as buffer agent)
—— Na-succinate 0.15 M containing medium,
----- Na-succinate 0 containing medium,
- · - · Na-succinate 0.3 M containing medium

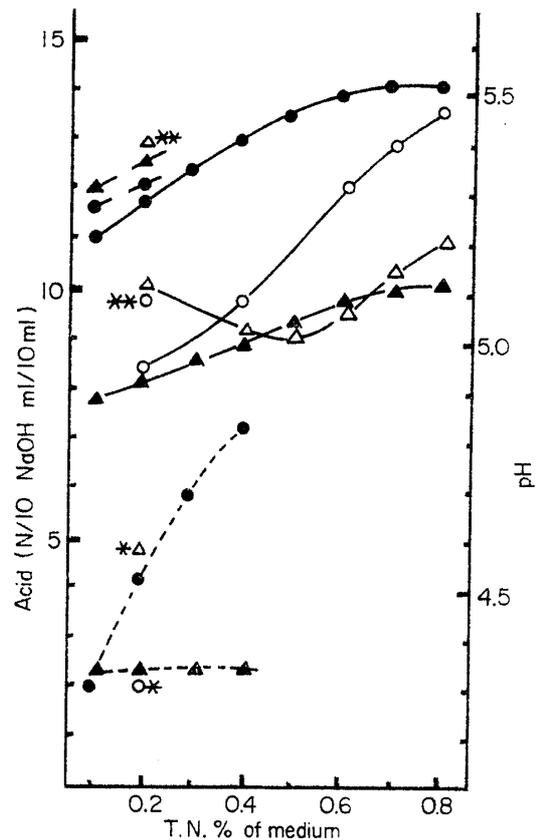


Fig. 2. Effect of soy-sauce concentration on acid production and final pH of *Ped. soyaе*.

Acid: marks and lines were as given in Fig. 1.
Final pH: ▲ SS-medium, △ PY+soy-sauce-medium

論として熟成ないし熟成に近い生しょう油を用いることで培地基材として常用のペプトン、酵母エキスにおきかえうることがわかる。

2. 生しょう油単独、および配合における培地組成の検討

前報²⁾ならびに実験 1 の結果から生しょう油を T.N. で 0.2% 以上用いた培地で菌体量は O.D. ではほぼ 0.6 以上の良好な増殖に達することがわかったが、実験 1 で T.N. 0.4% で増殖はなお上向きであったので、さらに熟成溜しょう油 (T.N. 約 2.1%) を用い加用量を T.N. 0.1~0.8 までにわたって増殖度、生酸量を比較し、加用最適量を検討した。また、T.N. 0.2% 以上では常用の細菌用培地としての N. 源は充分量とみなされるので、加用量の増大に伴う増殖の向上は N. 源、生育促進栄養素の補足効果というよりも、その他の要因、たとえば加用による培地緩衝能の増強に起因するのではないかと考え、(次項に詳述するごとく、本菌にとっては pH 下降が増殖抑制をもたらすきわめて重要な要因となるため) 各培地の緩衝能を解析した。Fig. 1 に増殖度、Fig. 2 に生酸量、最終 pH を示す。SS-培地、PY-培地に生しょう油を加用した培地ともに T.N. 0.7% あたりまで N. 濃度が増すにつれて増殖が良くなるが、それ以上の N. 濃度ではむしろ増殖は低下する。生酸量も T.N. 0.7% あたりが最高である。

各培地における最終 pH は緩衝剤 (0.15M の Na-succinate) を用いるとほぼ 5.0 ± 0.1 にある。緩衝剤を用いないと 4.4 以下にまで下り、また常用の 2 倍量 (0.3M) を用いると 5.4 前後におちつく。そして生しょう油添加量がふえるにつれて生酸量の増加にもかかわらず、若干 pH 下降は少なかったため、その原因はしょう油加用による培地緩衝能の増強に基づくものと推定され、緩衝能の比較を行なった結果が Fig. 3~5 である。兩種培地ともに N. 濃度の増すにつれて緩衝能も増大しているが (PY-培地に生しょう油を添加した培地でははじめの調製 pH に若干のずれを生じ、正確に N. 濃度には比例していない。), Fig. 4 および Fig. 5 中にみられるご

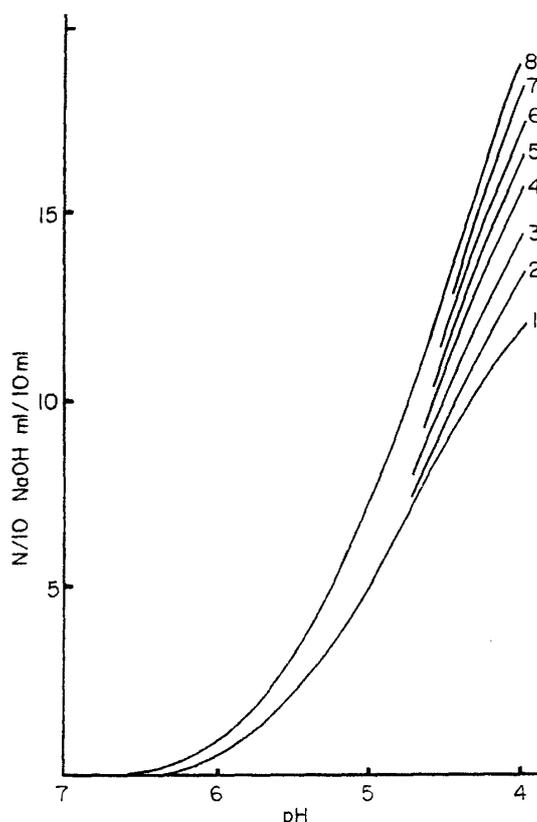


Fig. 3. Buffer capacities of SS-medium. Each medium containing soy-sauce as a concentration of T.N. %, 1: 0.1, 2: 0.2, 3: 0.3, 4: 0.4, 5: 0.5, 6: 0.6, 7: 0.7, 8: 0.8

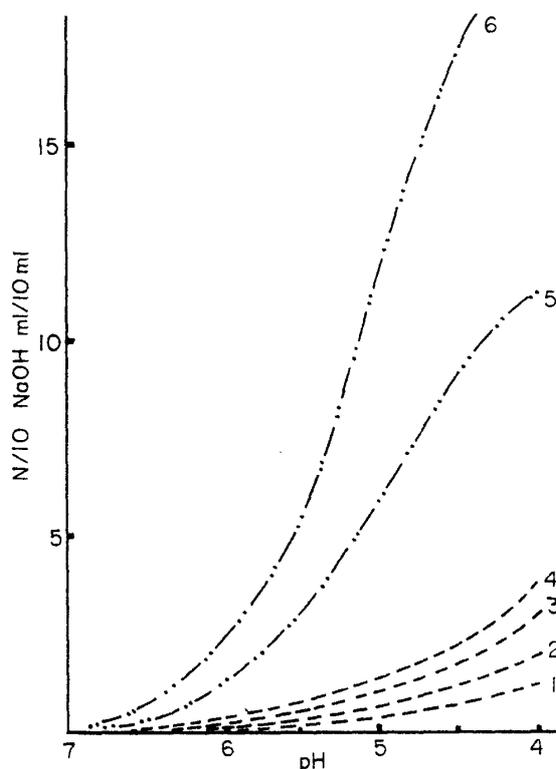


Fig. 4. Buffer capacities of soy-sauce and buffer agent.

1: soy-sauce T.N. 0.1%, 2: soy-sauce T.N. 0.2%, 3: soy-sauce T.N. 0.3%, 4: soy-sauce T.N. 0.4%, 5: Na-succinate 0.15M, 6: Na-succinate 0.3M

とく生しょう油, 酵母エキス, ペプトンのもつ緩衝能は比較的弱く, 各培地の緩衝能の大半は用いた Na-succinate の緩衝能に由来している。

本菌は酸性 pH に弱く, pH 5.5 以下では生育がび弱となり, 5.0 ではまったく生育のないことが報告されている⁴⁻¹⁰⁾。上記実験でも緩衝剤を用いない培地での増殖, 生酸の劣化はあきらかに pH 低下に由来するものとみなされ, N. 源濃度の増大は緩衝能を若干強めていることはうかがわれるが, 緩衝剤を用いてもなお最終的には本菌の好適 pH 域を維持することはできなかった。これらの点より, 次項においては培養中の pH 経過と増殖の関係をさらに検討し, 改めて最適 N. 源濃度などの培地組成について考察する。

3. 培養中の pH 経過と増殖

さきののべたごとく本菌が酸性 pH に弱い点から, 培養中の pH 下降が増殖を制限し, 菌数の減少をもたらすことはすでに報告されている¹¹⁻¹²⁾。著者らは緩衝剤の使用によってこの悪影響を防止しようとしたが, 緩衝剤併用下においてもなお pH 下降が増殖の制限となる懸念が強いので, 培養時の pH 経過と増殖度の関係を PY-培地, SS-培地の両者について実験した。結果を Fig. 6, Fig. 7 に示す。Fig. 6 (PY-培地) にお

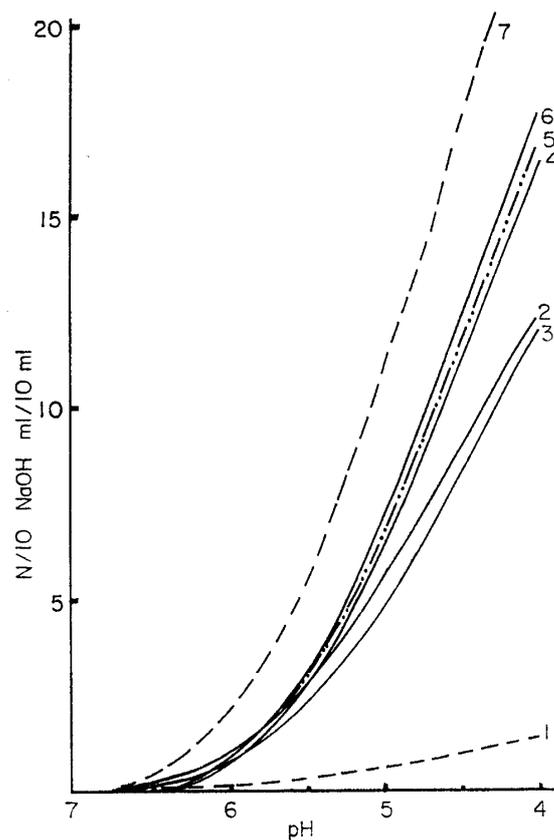


Fig. 5. Buffer capacities of PY-medium and PY+soy-sauce-medium.

1: PY-medium without buffer agent, 2: PY-medium, 3: PY+soy-sauce T.N. 0.2% medium, 4: PY+soy-sauce T.N. 0.4% medium, 5: PY+soy-sauce T.N. 0.5% medium, 6: PY+soy-sauce T.N. 0.6% medium, 7: PY-medium containing Na-succinate 0.3M as buffer agent.

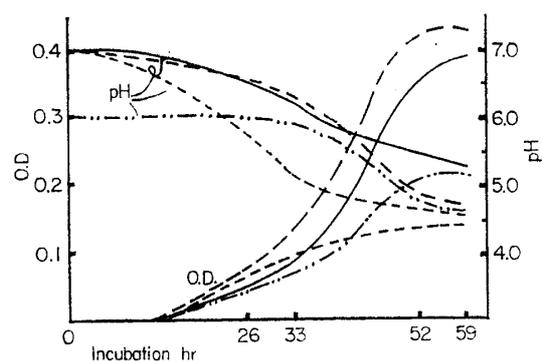


Fig. 6. Effect of pH on growth of *Ped. soyae* using PY-medium.

— used 0.15 M Na-succinate, - - - without buffer agent, - · - · - used Clark-Lubs buffer (pH 7.0), - - - - used Clark-Lubs buffer (pH 6.0)

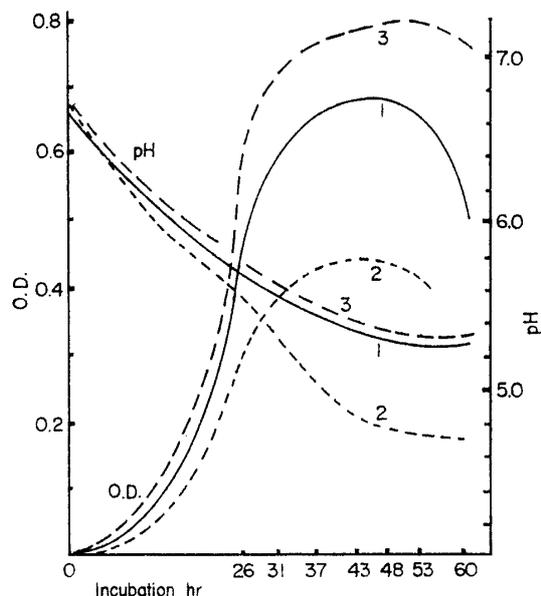


Fig. 7. Effect of pH on growth of *Ped. soyae* using SS-medium.

1: soy-sauce (Tamari) T.N. 0.2%, 2: soy-sauce (Tamari) T.N. 0.4%, without buffer agent, 3: soy-sauce (Tamari) T.N. 0.4%

Table 5. pH of culture medium during incubation.

Medium		0 hr	24	33	43	48	52	57	61	65	70	
PY (without buffer agent)	①	7.20	6.19	5.41	5.15	5.09	4.99	4.95	4.90	4.90	4.88	
	*②	7.20	6.20	5.70		5.65	5.20	5.26	5.35	5.40	5.30	
		0 hr	24	29	34	37	41	46	51	55	59	63
PY	*③	6.99	6.58	6.58	6.70		6.72	6.49	6.11	6.36	6.09	6.36
SS	T. N. 0.2% *④	6.45	5.67	5.84	5.89	6.20	6.20	6.55	6.50			
	T. N. 0.4% *⑤	6.50	5.73	5.86	5.88	6.45	6.32	6.67	6.73			

* pH was adjusted to 7.0 at intervals of 3~4hr.

いては常用の Na-succinate の外 Clark-Lubs buffer もテストしたが、いずれの場合も pH が 5.0 前後まで下ると増殖は停止し、この pH までの培地緩衝能によって増殖度が支配されるものと思われる。Fig. 7 (SS-培地, T. N. は 0.2 および 0.4%) でも pH 5.2~5.3 附近で増殖は停止しており、なお緩衝能の不足が増殖を抑制する原因となるものと推定される。しかし菌体量は PY-培地のほぼ 2 倍程度におよび、今までの試験でくりかえし考察したごとく、生しょう油が本菌の増殖培地としてすぐれた効果を有することがわかる。

したがって緩衝能の不十分さを補う手段を講ずれば、さらに増殖の向上が期待できると考え、培養途中でのアルカリ液添加による pH 修正実験を行なった。pH 修正は増殖のさかんな時期に 3~5 hr おきに 5%NaOH 溶液を滴下して pH を 7.0~7.2 にもどした。その際の pH 変化(修正寸前の培地 pH) を Table 5 に、増殖度を Fig. 8 に示す。Table 5 から緩衝剤を用いない PY-培地では 40 hr 内外で pH は 5.3~5.2 まで下り、そのまま存置してはもはや増殖が行なわれないが、同じ培地で以後 pH の経時修正をすれば、つぎの修正時までの下降は 5.6~5.2 の域にくいとめ得るし、緩衝剤を用いた PY-培地ではその下降下限を 6.1 以上におさえ得るとともに増殖度はかなり向上する。SS-培地での経時修正で pH はおおむね 5.7 以上に維持され、緩衝剤のみに依存した場合よりもはるかに増殖度はさらに向上する。すなわち、実験 2 で T. N. 0.7% を用いた時に得られた最高度の増殖に匹敵する菌体量が T. N. 0.4% 程度の培地で達成できる。このようにして本菌に対する生育栄養源としては T. N. 0.4% 程度の生しょう油成分で充分であり、不足する緩衝能を補うことによってきわめて良好な増殖が得られることがわかった。

総 括

前報¹⁾に引き続き生しょう油を基材とした *Ped. soyae* の効率的な培養、集菌のための培地組成を検討し、

1) 生しょう油の効果は同一 N. 濃度においては熟

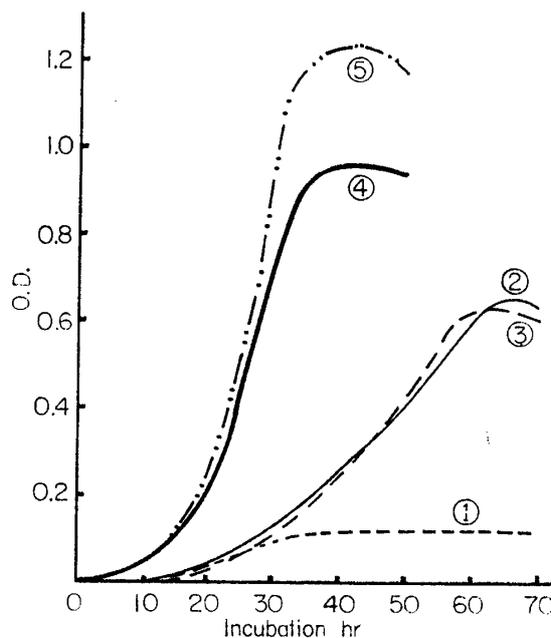


Fig. 8. Effect of pH adjustment during incubation on growth of *Ped. soyae*.

Medium and method were as given in Table 5.

成度（1ヶ月のものから13ヶ月経過の熟成品まで）に関係なくほぼ類似している。熟成品については普通しょう油と溜しょう油の差も認められない。しょう油麴抽出液は生しょう油よりも低濃度で増殖効果は大きい。培地用として調製上の容易さからは熟成、またはそれに近い生しょう油を用いるのが便利である。

2) アミノ酸液（味液）は増殖効果が少なく、むしろ低濃度の使用では阻害を示す場合がある。

3) 生しょう油培地は本菌の生育栄養源を豊富に含有し、通常のペプトン、酵母エキス併用培地に代替できることはもちろん、さらに良好な増殖が得られる。

4) 本菌の高度の生育のためには培地に充分の pH 緩衝能が必要である。試験した培地の緩衝能はその大半が添加した緩衝剤に依存しているが、なお不充分であり、生しょう油の使用量を増して若干緩衝能を補なうこともできるが、pH の経時調節（中和）が望ましい。

5) 全窒素で 0.4 % 程度の生しょう油を基材とした培地で pH の経時調節をあわせて行なうことにより、最高の菌体量が得られる。

終りにのぞみ終始御鞭撻を賜った鳥山史郎所長に深謝する。

本報告の概要は第12回全国味噌技術会研究発表会—昭39.4.24.—において発表した。

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) 好井, 細川: 本誌, 42 , 279 (1964). | 3 , 10 (1960). |
| 2) Nakagawa, A., Kitahara, K.: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 5 , 95 (1959). | 8) 薄田, 益子, 松尾: 本誌, 39 , 1 (1961). |
| 3) 野田醤油KK研究報告: 第 7 輯, 83 (1963). | 9) 望月, 小口: 信州味噌研報, No. 3 , 25 (1961) |
| 4) Sakaguchi, K.: <i>Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 22 , 353 (1958). | 10) 伊藤, 海老根, 小坂: 食糧研報, No. 18 , 28 (1964). |
| 5) 飯塚, 山里: 農化, 33 , 383 (1959). | 11) 望月, 本藤, 小口: 信州味噌研報, No. 3 , 30 (1961). |
| 6) 上野, 大亦: 本誌, 39 , 360 (1961). | 12) 望月: 食品工業, 7 , (22), 84 (1964). |
| 7) 本間, 今井, 桑原: 新潟県味噌技術会誌, No. | (昭 40. 2. 16 受付) |