

中国の発酵ハム「金華火腿」から分離した糸状菌の同定及び酵素活性

(中国の金華火腿に関する研究、第2報)

和久 豊*・角田潔和**・進藤 斉**・小泉武夫**

*株式会社ピオック

(〒441 愛知県豊橋市牟呂町内田 111-1)

**東京農業大学醸造学科

(〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

Identification and Enzyme Activity of Molds Isolated from Chinese Fermented Food "Jinhua Huotui"

(A study on a Chinese fermented food "Jinhua Huotui" part)

Yutaka WAGU*, Toshitaka KAKUTA**, Hitoshi SHINDO**,
and Takeo KOIZUMI**

*Bio'c Co.,Ltd., 111-1, Uchida Muro-cho, Toyohashi-shi, Aichi 441

**Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1, sakuragaoka, setagaya-ku, Tokyo 156,

"Jinhua Huotui" is a traditional fermented food produced in China. This study aims at the identification of molds from "Jinhua Huotui" and the investigation of their enzyme activities. They were identified 30 strains of genes *Penicillium* and 25 strains of genes *Aspergillus*. From genus *Penicillium*, *P. aurantiogriseum*, *P. solitum*, *P. implicatum*, *P. viridicatum*, *P. fellutanum* and others four kinds of molds were identified. From genus *Aspergillus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. candidus*, *Eurotium rubrum*, *E.amstelodami* and other three kinds of molds were identified. As to enzyme activities, genus *Penicillium* showed strong acidic protease activity, and, genus *Aspergillus* showed strong neutral and alkaline protease activities. Especially, *A.ochaceus* has strong protease activity as compared to standardstrain of *A. oryzae*. Genus *Penicillium*

showed stronger lipaseactivities than genus *Aspergillus*. Especially, *P. fellutanum* , *P.canescens* had very strong lipase activities. As to -amylase and phoshatase activities, all isolated molds from " Jinhua Huotui " showed low activities.

There results showed that genus *Asperillus* played the main role for decomposition of protein, and genus *Penicillium* played the main role for decomposition of lipid in " Jinhua Huotui

金華火腿は中国で製造されている伝統的発酵食品である。火腿製造における微生物の役割を解明することを目的に、本報では分離系状菌の同定及び酵素活性について検討した。火腿の糸状菌は *Penicillium* 属、*Aspergillus* 属のみで構成されていた。30 株の *Penicillium* 属より、*P.aurantiogriseum* , *P.solitum* , *P.implicatum* , *P.viridicatum* , *P.fellutanum* , 他 4 種類の菌が、25 株の *Aspergillus* 属では *A.ochraceus* , *Eurotium repens* , *A.sydowii* , *E.amstelodami* 他 4 種類が同定された。また、分離系状菌 249 株について酵素活性を検討した。その結果、プロテアーゼは *Penicillium* 属が酸性側で、*Aspergillus* 属が中性・アルカリ側で強力であった。特に *A.ochraceus* は、標準株(*A.oryzae*) のプロテアーゼに比べても強力な活性を有していた。リパーゼは *Penicillium* 属が全般に強く、特に、*P.fellutanum* , *P.canescens* が強力な活性を有していた。しかし、-アミラーゼ・ホスファターゼは全体にその活性は低かった。以上より、金華火腿における蛋白質の分解には *Aspergillus* 属が、脂質の分解には *Penicillium* 属が主として作用していると推察した。

金華火腿（以下火腿）とは 800 年前より中国浙江省金華地方で豚生肉に微生物を増殖させて製造され、高級な中華料理のだしなどに使用されている発酵ハムの一種である。火腿の最も大きな特長として、製造に通常の肉加工品で行われる加熱・くん煙の行程が無く、微生物による発酵工程があることが大きな特徴である。筆者らは火腿製造における微生物の作用について解明することを目的として研究を進めている。前報 1) では火腿の一般成分と微生物相について検討し、火腿の一般成分の特長として水分含量が 23.9% と低く、遊離アミノ酸（特にグルタミン酸）および 5'-イノシン酸が豚もも肉に比べ多いこと、微生物相は糸状菌が最も多く、次いで細菌・酵母の順であることを明らかにした。この様に分離微生物の中で糸状菌が優勢なことや、中国では火腿製造中にカビが発生しないと火腿の味・風味が向上しないとされていることから、糸状菌の品質への関与が示唆される。本報では火腿より分離した糸状菌の同定を行うと共に、火腿の各種成分の生成に関与していると思われる分離系状菌のプロテアーゼ、リパーゼなどの酵素活性について検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

前報1)で糸状菌数を測定したコロニーをMEA培地2)に釣菌し,同培地で平板培養を繰り返し純粋分離を行い,得られた糸状菌計249株を実験に使用した.なお,供試菌の一部にMEA培地で生育の悪い菌株39株が存在したので,純化および保存の培地としてMY20寒天培地3)を使用した.

2. 糸状菌の同定

糸状菌の同定は,成書4)5)6)従って行った.特に *Penicillium* 属は Pitt7)8)に従い,*Aspergillus* 属は Raperら9), Klichら10)の方法に従った.*Eurotium* 属の分類については Kozakiewics11)に従った.

3. 分離糸状菌の各種酵素活性の測定

3-1 糸状菌の培養 300ml容三角フラスコにフスマ10gを入れ,7.5mlの水を混合,3時間放置後121℃で30分間加圧殺菌した.これに25℃・7日間培養した供試菌株を斜面培地から培地ごと菌体(約5mm角)を切り取り,それぞれに接種した.攪拌後,25℃・7日間培養を行った.途中で生育状態を均一化するため,培養24時間目と40時間目にフスマを良く攪拌した.

3-2 酵素液の調製 分離糸状菌を培養したフスマ(原料フスマ10g,フラスコ1本分)に0.5%NaCl水溶液50mlを加え,室温で3時間酵素を抽出した.次いで,東洋ろ紙No.2にて濾過を行い,得られた上澄液を粗酵素液とし,適宜希釈して酵素活性を測定した.その際,標準株としてプロテアゼ,およびホスファタゼ活性が強力な株式会社ビオック保存菌株 *Aspergillus oryzae* KBN1031, -アミラゼ活性が強力な *A.oryzae* KBN525 およびリパゼ活性強力な *Eurotium repens* KBN2062 を供試し,各々の酵素活性を測定した.

3-3 各種酵素活性の測定

(1) プロテアゼ 国税庁所定分析法注解12)に準じて,Hammarstenのミルクカゼイン(Merck社)2%溶液を基質として,反応温度38℃,反応pH3.0,6.0,9.0における活性を測定した.活性の表示は粗酵素液1mlが38℃1分間にL-チロシン1μgを生ずるプロテアゼ活性を1単位とした.

(2) リパゼ 町田ら13)の方法に従い,オリーブ油エマルジョン(オリーブ油25%(V/V)含有)を基質として反応温度37℃,反応pH7.0における活性を測定した.活性の表示は,粗酵素液1mlが37℃1分間に1μMの脂肪酸を遊離する酵素量を1単位とした.

(3) -アミラゼ 国税庁所定分析法注解14)に準じて,可溶性デンプン1%溶液を基質として反応温度40℃,pH5.0の条件で測定を行った.活性の表示は粗酵素液1mlのWohlgemuth値として表示した.

(4) ホスファタゼ 難波らの方法15)により準じて,10mM p-Nitrophenyl phosphate disodium 溶液を基質として反応温度30℃,反応pH5.0及び9.0における活性

を測定した。活性は粗酵素液 1ml が 30 1 時間に 1 μ M の p-Nitrophenol を遊離する酵素量を 1 単位とした。

実験結果

1. 分離糸状菌の同定 供試菌株 249 株は顕微鏡観察の結果、

- 1) 菌糸に隔壁を有する
- 2) 分生子形成はフィアロ型
- 3) 分生子柄先端に複数のフィアライドを群生する
- 4) 分生子は球状～楕円形で 1 細胞により形成する
- 5) 分生子は塊状とならず連鎖する

という共通の特長を有していた。その中で 145 株は、コロニー表面の色が緑色系であり、また、分生子柄が直接分岐してフィアライドを形成する、あるいは分生子の先端が膨らむが柄足細胞が認められないことから *Penicillium* 属と同定した。残り 104 株は分生子柄の先端が膨大して頂のうとなり、多数のフィアライドを形成して分生子を生じること、および柄足細胞が観察されることから *Aspergillus* 属と同定した。このように *Penicillium* 属、*Aspergillus* 属のみが火腿から検出されたのは、火腿の水分 1) が 23.9%、水分活性 0.80 (コンウェイユニット法 16) による) と低い事から、比較的低い水分活性でも生育する *Penicillium* 属、*Aspergillus* 属 17) が選択的に生育したためであると思われる。

(1) *Penicillium* 属の同定

Penicillium 属 145 株は、CYA 培地上での生育速度、コロニーの状態を観察し、9 種のグループに分類した。各グループの特徴を Table 1 に示した。各グループより最低一株が選択される割合で任意に菌株を選択し、計 30 株を同定に供した。

選択した 9 グループ 30 株について同定のため、CYA・MEA・G25N 2) 培地上における生育速度、コロニーの状態、および顕微鏡による形態観察を行った。そのうち、培養温度 25 (Tab.1)を除く CYA での状態を Table 2 に示した。

P-1 は単輪生で分生子壁が滑面、生育が遅いことから *P. implicatum* と同定した。

P2~5 は複輪生で、P2~4 は *Furcatum* 亜属に属し、P-2 が分生子柄壁・分生子壁が滑面であることから *P. fellutanum*、P-3 は分生子柄壁が粗面、分生子壁が滑面であることから *P. canescens* と同定した。また、P-4 は分生子が球形で分生子壁が滑面であることから、*P. raistrickii* と同定した。P-5 は *Biverticillium* 亜属に属し、ピロード状の灰緑色のコロニーで、栄養菌糸が黄色であることから、*P. variable* と同定した。

P-6~9 は三輪生で、P-6 は青緑色のコロニーで分生子柄壁は粗面、分生子壁は滑面であることから、*P. aurantiogriseum* と同定した。P-7 はピロード状の鈍緑色のコロニーで、ペニシリは密着型などから、*P. solitum* と同定した。P-8 はピロード状～粒状のコロニーで、分生子壁が粗面などの性質から、*P. viridicatum*、P-9 は鈍緑色のコロニーで分生子柄、分

生子とも粗面であることから，*P.echinulatum* と同定した。

(2) *Aspergillus* 属の同定

Aspergillus 属 104 株についても，*Penicillium* 属の場合と同様に CYA 培地上での生育速度，コロニーの特徴から，8 グループ (A-1~5，U-1~3) に分別した。なお，前述の MEA 培地上で生育が悪く，MY20 寒天培地で単離および保存を行った 39 株はすべて *Aspergillus* 属で，U-1~3 のグループに属していた。

各グループの特長を Table3 に示した。次に 8 グループから *Penicillium* 属の場合と同様に供試菌 25 株を選択し，CY20S 18)・MEA 培地上における生育速度，コロニーの状態の観察，および顕微鏡観察を行った。その結果を Table4，5 に示した。

A-1~5 の 5 グループはすべてメトレを有していた。A-1 は黄褐色の胞子を形成し，鈍いピンク色の菌核を形成することから *A.ochraceus* と同定した。A-2 は分生子の色が青緑色で生育が遅くヒューレ細胞が観察されることから *A.sydowii*，A-3 は菌糸の色が白色，黄色，オレンジ色と変化することから *A.versicolor* と同定した。A-4 は白い胞子を形成し，頂のうのほぼ全面をメトレが覆っているなどから，*A.candidus*，A-5 は生育が早く分生子柄が 1.5~2.0mm と長く，胞子が滑面で直径が大きいなどから，*A.oryzae* と同定した。

U-1~3 の 3 グループは CY20S 培地で生育の良い好乾性な菌株で，黄色の子のう胞子を形成することから，*Aspergillus* 属のテレオモルフ種であり，分生子頭が放射状からやや円筒状，厚膜細胞を形成せず，柔らかい子のう果壁を持つ黄色の子のう果を多数形成する，などの特長から *Eurotium* 属に属すると判断された。

U-1~3 の形成する子のう胞子はいずれも 6 μm 以下であり，U-1，2 は子のう胞子赤道面での溝は明確でなく，U-3 は，子のう胞子赤道面に溝が明確に観察された。U-1 は子のう胞子表面が滑面で，コロニーの裏面の色が暗褐色であることから *Eurotium rubrum*，U-2 はコロニーの裏面の色が黄橙色，分生子頭が 150-180 μm と大きく，子のう果の上方に形成されていることから，*E.repens* と同定した。U-3 は子のう胞子の表面が粗で，子のう果の形成が分生子に比べ優勢である事から，*E. amstelodami* と同定した。

以上の同定結果より求めた，火腿分離糸状菌 249 株の菌種の構成比を，Table6 に示した。*P.aurantio-griseum* が全体の 17.3% を示し，次いで *P.solitum* が 11.6%，*A.ochraceus* が 11.2%，*A.sydowii* が 8.8% となっていた。畜肉製品から分離された糸状菌として，ハム・ソーセージから *E.rubrum*，*P.variabile* 19)，発酵型サラミソーセージから *P.viridicatum*，*A.versicolor*，*A.candidus* 20) などが報告されている。また Ciegler ら 21) は今回分離された *P.viridicatum* を発酵型サラミソーセージの主な加工菌の 1 つとして報告している。

火腿と同様に糸状菌を生育させ製造するかつお節から分離された糸状菌として，宇田川ら 22) は，*A.repens*，*A.oryzae*，*A.ochraceus*，*E.amstelodami*，*P.aurantio-griseum*，*P.echinulatum*，*P.steckii*，*Monilia* sp，谷川ら 23) は *A.candidus*，*A.sydowii* などを報告している。この様に，火腿より分離された菌株とハム・ソーセージ・かつお節などが

ら分離報告されている菌種は近似しており肉基質に生育する共通の菌と推察した。

火腿は 800 年前より食用とされており、また、前報 1) の通り、火腿からアフラトキシン (G1, G2, B1, B2), オクラトキシン A, パツリン, ゼアラレノンのいずれも検出されず、また、シトリニンもその後の検討の結果不検出であった。一方、今回分離・同定された同種の糸状菌におけるマイコトキシン生産性については、食肉由来の *P.viridicatum* のシトリニン生産性 24)・オクラトキシン A 生産性 25) 26), *A.ochraceus* のオクラトキシン A 生産性 27), *A.versicolor* のステリグマトシスチン生産性 28) などが報告されており、今回分離同定された糸状菌についても検討が必要と思われる。2. 分離糸状菌の酵素活性 Table 7 (1) プロテアーゼ活性

分離糸状菌 249 株のプロテアーゼ活性を測定した結果を Table 7 に示した。通常生肉の極限 pH は pH5.4~5.5 29) であり、また火腿の pH が pH5.85 1) であることから、火腿のタンパク質分解は、pH6.0 でのプロテアーゼ活性が主体を成すと思われる。pH6.0 でのプロテアーゼ活性は *Penicillium* 属は低いものの、*Aspergillus* 属は全般に強く、中でも *A.ochraceus* の平均値は 363unit と特に高い値を示していた。また、標準株と比較して 2 倍を超える活性を持つ菌株も 3 株存在した。このため、pH6.0 でのプロテアーゼ活性の強力な *A.ochraceus* の生肉蛋白質の分解への寄与が示唆された。一方、*Penicillium* 属のプロテアーゼが酸性側で、より高い傾向を示したことについては松嶋らの報告 30) と一致した。

-アミラーゼ活性を測定した結果を Table 8 に示した。分離糸状菌の -アミラーゼ平均活性は標準株に比べ約 1/20 と低く、その分布は活性の低い区分に集中していた。筋肉中のグリコーゲンは屠殺後、速やかに乳酸へと分解されること、分離糸状菌の -アミラーゼが極めて低いことから、-アミラーゼが火腿の品質に与える影響は少ないと推察した。*Aspergillus* 属の -アミラーゼ活性が *Penicillium* 属に比べ、全体として高い値となっているが、これは、*A.oryzae* 6 株の -アミラーゼ活性が 1,000unit を越えているためであり、6 株を除いた *Aspergillus* 属の平均活性値は 37 となり、*Penicillium* 属の平均値 95 に比べ低い値となっていた。

分離糸状菌のリパーゼ活性を測定した結果を Table 9 に示した。供試菌 249 株のリパーゼ活性は平均 3unit となっていた。現在日本の醸造用に使用されている麹菌 (*A.oryzae*, *A.sojae*) のリパーゼ活性が 2unit 以下(データ未公開)であることから、分離された糸状菌のリパーゼ活性は比較的高い値と思われる。分離した *Aspergillus* 属は 2unit 以下の菌株が約 70% を占め、特に活性が強力な菌株は認められなかった。しかし、*Penicillium* 属にはリパーゼ活性の高い菌株が存在しており、脂肪の分解には *Penicillium* 属が主体となっているものと推察した。その中で、*P.fellutanum*, *P. canescens* と同定された 3 株は標準株 KBN2062 より高い活性を有していた。

高尾ら 31) によると食肉に生育した微生物の生産するリパーゼは脂肪をグリセリンと脂肪酸に分解し、生成された不飽和脂肪酸は空気中の酸素などにより過酸化物を生じると

される。一方、かつお節製造では、製造中に繁殖する糸状菌の中で *A.glaucus* が有用菌とされるが、それは、この菌株がリパ - ゼ活性が強く、その作用が原料中の脂質を減少させるのに必要なためであるとされている(32)。火腿は長年食品として使用されており、製品に脂肪の酸化臭は認められないことから、過酸化物が多く含まれているとは考えにくく、リパ - ゼの存在はかつお節製造時と同様に有用に働いているものと思われる。

分離糸状菌のホスファターゼを測定した結果を Table 10 に示した。ホスファターゼは核酸系呈味成分を呈味性のないヌクレオシドに分解することが知られている(33)。供試菌 249 株のホスファターゼ活性は標準株 KBN1031 に比べ、pH5.0 の活性において 1/10 以下、pH9.0 の活性は 1/50 と極めて低い値であった。このため火腿中の微生物の中で最も数の多い糸状菌のホスファターゼ活性が低いことは火腿中のイノシン酸含量の保持に有効と推察した。

以上より火腿製造への糸状菌の関与はタンパク質の分解に *Aspergillus* 属由来のプロテアーゼが、脂肪の分解に *Penicillium* 属由来のリパーゼが主体に作用していることが推察された。

要 約

中国の金華火腿より分離した糸状菌の同定、酵素活性の測定を行った。(1) 火腿から分離された糸状菌は比較的低い水分活性でも生育する *Penicillium*、*Aspergillus* 属で構成されていた。(2) *Penicillium* 属では *P.aurantiogriseum*、*P.solitum*、*P.implicatum*、*P.viridicatum*、*P.fellutanum*、他 4 種類の菌が、*Aspergillus* 属では *A.ochraceus*、*E.repens*、*A.sydowii*、*E.amstelodami* 他 4 種類が同定された。以上より火腿には *Penicillium* 属 9 種、*Aspergillus* 属 8 種、計 17 種の糸状菌が分布していた。(3) プロテアーゼ活性は酸性側で *Penicillium* 属、中性～アルカリ側で *Aspergillus* 属が強力であった。pH6.0 でのプロテアーゼ活性の強い菌種は *A.ochraceus* であり、原料の分解に関与すると考えられた。(4) リパーゼは *Penicillium* 属での活性が高く、火腿製造時における脂質の分解は *Penicillium* 属が主体と推察した。*Penicillium* 属の中では特に *P.fellutanum*、*P.canescens* が強い活性を有していた。(5) 分離糸状菌の α-アミラーゼは全体に活性は低く、火腿の品質へ与える影響は少ないものと推察した。(6) 分離糸状菌のホスファターゼ活性の強い菌株は存在しておらず、そのため 5'-イノシン酸が高く維持されているものと推察した。

以上より火腿に生育する糸状菌は、その低水分活性のため、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属が選択的に生育し、蛋白質分解は *Aspergillus* 属が、脂質の分解は *Penicillium* 属が主体となっているものと思われた。

「欄外見出し」

和久・他:金華火腿の糸状菌

中国の発酵ハム「金華火腿」から分離した糸状菌の同定及び酵素活性†

和久 豊*・角田潔和**・進藤 斉**・小泉武夫**

-----「脚注」-----

†中国の金華火腿に関する研究(第2報)

*株式会社 Bio-ock (〒441 愛知県豊橋市牟呂町内田 111-1)

**東京農業大学醸造学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

文 献

- 1)和久 豊・角田潔和・進藤 進・小泉武夫:日食工誌, 41,921(1994).
- 2)Pitt,J.I.:A Laboratory Guide to Common Penicillium Species, C.S.I.R.O.,Division of Food Processing,North Ryde, Australia, p7(1988).
- 3)Raper,K.B., Fennell,D.I., : THE GENUS Aspergillus, Williams and Wilkins, p.40(1965).
- 4)椿啓介:微生物の分類と同定<上>,長谷川武治編,(学会出版センター,東京),(1984).
- 5)杉山純多:カビの分類・培養・同定と有用物質の生産・応用,カビ応用開発研究会編(テクノアイ出版部,東京), p.15(1984).
- 6)宇田川俊一・椿 啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹生・横山竜夫・渡辺昌平:菌類図鑑(下),講談社サイエンティフィック編(講談社,東京), p.843 (1984).
- 7)Pitt,J.I.:The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces,Academic Press,London (1979).
- 8)Pitt,J.I.:A Laboratory Guide to Common Penicillium Species, C.S.I.R.O.,Division of Food Processing,North Ryde, Australia, (1988).
- 9)Raper,K.B., Fennell,D.I., : THE GENUS Aspergillus, Williams and Wilkins, (1965).
- 10) Klich,M.A.and Pitt,J.: A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and Their Telemorphs, C.S.I.R.O., Division of Food Processing, North Ryde, Australia, (1988).
- 11)Kozakiewics, Z.: Aspergillus species on stored products, C・A・B International,Oxford,UK, (1989).
- 12)第3回改定国税庁所定分析法注解注解編集委員会編(日本醸造協会,東京),p.222(1974).
- 13)町田晴夫・東 俊彦・山田浩一:醗協誌, 22, 427 (1964).
- 14)第3回改定国税庁所定分析法注解注解編集委員会編(日本醸造協会,東京),p.218(1974).

- 15)難波康之助・戸塚 昭・伊藤 清：醸協，72，893 (1977).
- 16)秋葉 稔：食品分析法，日本食品工業学会食品分析法編集委員会編（光琳，東京）p.579（1982）.
- 17)宇田川俊一・鶴田 理：かびと食物，(医歯薬出版株式会社，東京)，p.173(1980).
- 18)Klich,M.A.and Pitt,J.: A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and Their Telemorphs , C.S.I.R.O. , Di- vision of Food Processing, North Ryde, Australia , p.6(1988).
- 19)Sutic,M.,Ayres,J.C.,and Koehler,P.E., Appl.Microbiol.,23,656(1972).
- 20)高鳥浩介，食衛誌，16，307 (1975) .
- 21)Ciegler,A.,Mintzloff,H.-J.,Weoislede R,D.and Leistner,L. :Appl.Microbiol., 24 , 114(1972).
- 22)宇田川俊一・椿啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹男・横山竜夫・渡辺昌平：菌類図鑑，(上)講談社サイエンティフィック編（講談社，東京），(講談社，東京），p.143(1978).
- 23)谷川英一・坂井稔：水産微生物学，(恒星社厚生閣，東京)，p.450 (1960).
- 24)Wu,M.T., Ayres,J.C.and Koehler,P.E.: Appl.Microbiol.,27,427(1974).
- 25)Van Walbeek,W,P.M.Scott,J.Harwig,and J.W.Lawrence:A.Can.J.Microbiol.,15, 1281(1969).
- 26)杉本貞三，南沢正敏，高野和子・笹村靖子・鶴田理：食衛誌,18,176(1977)
- 27)Escher,F.E.,Koehler,P.E.and Ayres,J. C.:Appl.Microbiol.,26,27(1973).
- 28)Halls,N.A.,and Ayres,J.C.:Appl.Micro- biol.,26,636(1973).
- 29)斉藤義蔵・小島正秋・金子恒男：食肉加工法，(恒星社厚生閣，東京)，p.71(1968).
- 30)松嶋欽一・仁保 健・嶋田 協：農化，54，871 (1980).
- 31)高尾壽郎・安井 勉：食品工業，(恒星社厚生閣，東京)藤巻正生・三浦 洋・大塚謙一・河端俊治・木村 進編集，p.656(1985).
- 32)谷川英一・坂井稔：水産微生物学，(恒星社厚生閣，東京)，p.448(1960).
- 33)藤島鉄郎・吉野宏・千葉秀男：調味科学，13，(2)， 1(1966) . 1

Table1 Grouping of *Penicillium* sp. isolated from Jinhua Houtui

No. of Group	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	P-9
Diameter (mm)	15 -20	16 -21	31- 33	38 -42	13 -15	29 -33	24 -28	29 -35	31- 33
Color	Greyish -green	Gray	Dark -green	Dull -green	Greenish -gray	Dull -green	Dark -green	Yellow -green	Dark -green
Texture	Vel	Vel	Flo -Gra	Vel	Vel	Vel	Vel	Vel-Gra	Vel-Gra
Sulcate	Radially	Radially	Radially	Plane	Plane	Radially	Radially	Radially	Radially
Conidiogenesis	Moderate	Light	Light	Light	Heavy	Heavy	Heavy	Moderate	Heavy
Sclerotium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mycelium color	White	White	White	White	Yellow	White	White	White	White
Reverse color	Brown	Pale -gray	Orange -brown	Yellow -brown	Orange	Orange	Brown	Orange -brown	Orange -brown
Exudate (color)	-	+ Clear	+ Clear	+ Clear	-	+ Clear	-	+ Brown	+ Clear
Soluble Pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-

All plates are observed after 7days incubation on CYA at 25 .

Vel , velutinous ; Gra , granular ; Flo ,flocuose ; - , Absent ; + , Present

Table 2 Morphological characteristics of Penicillin genus isolated from Jinhua Huotui

No. of Group	P-1	P-2	P-3	P-4	P-5	P-6	P-7	P-8	P-9
Penicillus type	Mon	Bi	Bi	Bi	Bi	Ter	Ter	Ter	Ter
feature	a)	b)	b)	c)	d)	e)	e)	e)	e)
Colony on CYA									
Germination at 5	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Growth at 37	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape and size (µm)									
f) Phialides	Amp 11-13 x 2.0-2.6	Amp 4-8 x 2.2-2.4	Amp 8-10 x 2-2.6	Amp 7-11 x 2.9	Ace 9-12 x 2.5-2.8	Amp 8-11 x 2.6-2.9	Amp 9-12 x 2.5-2.9	Amp 8-11 x 2.2-2.7	Amp 8-10 x 2.5-3.1
Metulae	-	12-25 x 2.2-2.6	11-22 x 2.8-3.8	5-13 x 3.1-3.6	11-13 x 2.5-2.8	12-13 x 2.9-3.3	12-14 x 2.7-3.0	10-16 x 3.5-4.7	11-22 x 3.2-3.5
Conidia	Sus 2.5-3.0	Ell 2.0-3.0	Sph 2.0-3.0	Sus Sph - 2.0-3.0	Ell 3.0-4.5	Sus Sph - 3.0-4.0	Sph - Sus 3.0-5.0	Sus - Ell 3.0-4.0	Sph 3.2-4.0
Surface texture f)									
Stipes	S	S	R	R	S	S-Fr	S-Fr	R	R
Conidia	S	Fr	S	S	S-Fr	S	S	S	R
Proposed species	<i>P. implicatum</i>	<i>P. fellutanum</i>	<i>P. canescens</i>	<i>P. raistrickii</i>	<i>P. variable</i>	<i>P. aurantio-griseum</i>	<i>P. solitum</i>	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. echinulatum</i>

Mon, monoverticillate ; Bi , biverticillate ; Ter, terverticillte ; Vel , velutinous ; Gra , granular ; Flo ,floccose ; - , No-growth, No-germination ; + , Growth, Germination
Amp, Ampulliform ; Ace, acerose ; Sus , subspherica ; Sph , spherical ; Ell , ellipsoidal ; S , smooth ; R , rough ; Fr, finely rough ; Vr , very rough

a) Stipes vesiculate, b) Penicilli terminal verticils of metulae, subterminal and intercalary metulae, c) Penicilli terminal verticils of metulae,
d) With subterminal rami, e) One to two rami produced, borne terminally, f) Incubation on CYA 7days at 25

Table3 Morphological characteristics of *Aspergillus* sp. isolated from Jinhua Huotui

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	U-1	U-2	U-3
Color	Yellow - buff	Dark -turquoise	Grey green	White	Olive brown	Grey green	Grey green	Greyish -green
Diameter (mm)	42 - 60	18 - 20	18 - 24	16 - 20	65 - 70	1 - 7	5 - 12	10 - 13
Texture	Vel - flo	Vel -flo	Vel - flo	Vel	Flo	Vel	Vel	Vel
Sulcate	Plane	Radially	Radially	Plane	Plane	Plane	Plane	Plane
Conidiogenesis	Heavy	Heavy	Heavy	Heavy	Moderate	Light	Light	Light
Sclerotia	+ (Dull pink)	-	-	-	-	-	-	-
Mycelium color	White	White	White- buff	White	White	Yellow	Yellow -orange	White
Reverse color	Dull - yellow	Maroon	Brown	Yellow	Uncolor	Yellow	Yellow -orange	Brown
Exude	-	-	-	-	-	-	-	-
Soluble pigment	-	-	-	-	-	-	-	-

All plates are observed after 7days incubation on CYA at 25 .

Table 4 Morphological characteristics of *Aspergillus* genus isolated from Jinhua Huotui

No. of Group		A-1	A-2	A-3	A-4	A-5
Colony diameter on CYA at 37 (mm)		26 - 34	3 - 5	4 - 6	20 - 23	55 - 60
Colony on CY20S ^{a)}	Diameter (mm)	54 - 60	24 - 31	19 - 33	17 - 32	58 - 70
	Color	Wheat, Ochraceus	Dark green, Dark turquoise	Dull green	White	Olive brown
	Texture	Vel - flo	Vel	Flo - gra	Flo	Flo
	Mycelium color	White	White	White	White	White
	Reverse color	Brown	Orange brown	Uncolor Red brown	Uncolor	Yellow
Colony on MEA ^{a)}	Diameter (mm)	45 - 57	16 - 32	14 - 24	10 - 23	62 - 70
	Color	Pale Light yellow	Dark green Dark turquoise	Greyish green	White Pale yellow	Olive brown
	Texture	Flo	Flo (Gra)	Vel	Gra	Flo
	Mycelium color	White	White	White	White	White
	Reverse color	Yellow	Dull green, Red brown	Orange brown	Pale yellow	Uncolor
Shape and size ^{b)} (μm)	Vesicles	Glo (29 -36)	Glo (6 -15)	Glo (8 -17)	Glo (8-18)	Glo (20-40)
	Phialides	10- 4 × 2-3	5-8 × 2-3	4-7 × 2-3	6-10 × 2-3	9-12 × 3-5
	Conidia	Sph - EIII (2.5 - 3.2)	Sph (2.5 - 4.0)	Sph (2.5 - 3.5)	Sph (2.5 - 4.0)	Sph - Sus (4.0 - 7.0)
Surface texture ^{b)}	Stipes	R	S	S	S	S - Fr
	Conidia	S	R	R	S	S
Others ^{b)}			Hülle cell	Hülle cell		
Proposed species		<i>A.ochraceus</i>	<i>A.sydwii</i>	<i>A.versicolor</i>	<i>A.candidus</i>	<i>A.oryzae</i>

a) Incubation in 7days at 25 , b) Incubation on CYA in 7days at 25

Table 5 Morphological characteristics of *Eurotium* genus isolated from Jinhua Huotui

No. of group		U-1	U-2	U-3
Colony on CY20S ^{a)}	Diameter (mm)	40-55	38-44	35-47
	Color	Yellow orange Dull green	Red orange Dull green	Dull green Yellow
	Texture	Vel	Vel - gra	Vel
	Mycelium color	Yellow	Orange	White,yellow
	Reverse color	Pale orange	Deep maroon	Dull-green
Colony on MEA ^{a)}	Diameter (mm)	2-8	0.9-1.2	15-24
	Color	Yellow	Yellow red	Dark green
	Texture	Vel	Vel	Vel
	Mycelium color	Yellow	Yellow red	White,yellow
	Reverse color	Yellow	Red	Yellow green
Shape and size (μm) b)	Vesicles	Glo – Sug (20-32)	Glo - Sug (25-40)	Glo - Sug (15-35)
	Conidial head	Radiate	Radiate	Radiate to columnar
	Phialides	7-10 × 4-7	7-9 × 3-4	6-9 × 3-5
	Conidia	Sph (4.5 - 9.0)	Sph (5.0 - 8.0)	Sph (3.0 - 5.0)
	Surface texture ^{b)}	Stipes	S - Fr	S - Fr
Conidia		Vr	Vr	Vr
Color		Yellow	S – Fr	S - Fr
Cleistothechia ^{c)}	Shape	Sph-Sus	Sph-Sus	Glo
	Size (μm)	70-105	80-120	120-145
	Shape and Size(μm)	Len(4.5-5.5 × 4.5-5.0)	Len(5.5-7.0 × 5.0-6.5)	Len(4.5-5.0 × 3.5-4.0)
Ascospore ^{c)}	Furrow	Trace	Trace	V-shaped
	Surface texture	S	S	R
	Proposed species	<i>E.rubrum</i>	<i>E.repens</i>	<i>E.amstelodami</i>

Glo,globose ; Sug,subglobose ; Len,lenticular

a) Incubation in 7days at 25 , b) Incubation on CY20S in 7days at 25 ,
 c) Incubation on CY20S in 14days at 25

Table 6 Identification of mold isolated from Jinhua Huotui

Identified mold	Rate of total isolated mold (%)	Identified mold	Rate of total isolated mold (%)
<i>P.aurantiogriseum</i>	17.3	<i>A.ochraceus</i>	11.2
<i>P.solitum</i>	11.6	<i>A.sydowii</i>	8.8
<i>P.implicatum</i>	7.6	<i>E.repens</i>	6.8
<i>P.viridicatum</i>	7.6	<i>E.amstelodami</i>	5.6
<i>P.fellutanum</i>	6.0	<i>E.rubrum</i>	3.6
<i>P.canescens</i>	2.0	<i>A.candidus</i>	1.6
<i>P.echinulatum</i>	2.0	<i>A.oryzae</i>	3.2
<i>P.raistrickii</i>	2.0	<i>A.versicolor</i>	0.8
<i>P.variabile</i>	2.0		

Number of total isolated mold : 249strains

Table 7 Protease activity of the mold isolated from Jinhua Huotui

Protease activity	Count of mold								
	pH 3.0			pH 6.0			pH 9.0		
	<u>Pen.</u>	<u>Asp.</u>	Total	<u>Pen.</u>	<u>Asp.</u>	Total	<u>Pen.</u>	<u>Asp.</u>	Total
0 - 100	126	100	226	137	43	180	140	44	184
101 - 200	10	4	14	8	13	21	5	5	10
201 - 300	6	0	6	0	17	17	0	19	19
301 - 400	1	0	1	0	17	17	0	14	14
401 - 500	1	0	1	0	6	6	0	9	9
501 - 600	1	0	1	0	5	5	0	9	9
701 over	0	0	0	0	3	3	0	4	4
Average of activity	42	20	33	37	175	94	22	224	105

Standard strains(*Aspergillus oryzae* KBN1031) activity

: pH3.0,112 ; pH6.0,321 ; pH9.0,401

Protease activity was measured under the conditions described in Materials and Methods.

Table 8 -Amylase activity of the mold isolated from Jinhua Huotui

-Amylase activity	Count of mold		
	Pen.	Asp.	Total
0 - 100	87	91	178
101 - 200	51	7	58
201 - 300	6	0	6
301 - 400	1	0	1
601 Over	0	6	6
Average of activity	147	71	111

Standard strains(*Aspergillus oryzae* KBN525) activity : 2247

-Amylase activity was measured under the conditions described in Materials and Methods.

Table 9 Lipase activity of the mold isolated from Jinhua Huotui

Lipase Activity	Count of mold		
	<u>Pen.</u>	<u>Asp .</u>	Total
0 - 2.5	45	73	118
2.6 - 5.0	52	21	73
5.1 - 7.5	21	7	28
7.6 - 10.0	10	2	12
10.1 - 12.5	7	1	8
12.6 - 15.0	4	0	4
15.1 - 17.5	3	0	3
17.6 - 20.0	1	0	1
20.1 over	2	0	2
Average of activity	3.8	1.6	3.0

Standard strain(*Eurotium repens* KBN2062) activity : 15.3

Lipase activity was measured under the conditions described in Materials and Methods.

Table 10 Phosphatase activity of mold isolated from Jinhua Huotui

Phosphatase activity	Count of mold					
	pH5.0			pH9.0		
	Pen.	Asp.	Total	Pen.	Asp.	Total
0 - 200	109	72	181	144	103	247
201 - 400	22	6	28	1	1	2
401 - 600	6	10	16	0	0	0
601 - 800	3	7	10	0	0	0
801 - 1000	2	6	8	0	0	0
1001 over	3	3	6	0	0	0
Average of activity	160	277	208	31	58	42

Standard strain(*Aspergillus oryzae* KBN1031) activity : pH5.0 ; 2436 , pH9.0 ; 2055
 Phosphatase activity was measured under the conditions described in Materials and Methods.